

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2005 年 9 月 15 日 (15.09.2005)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2005/085271 A1

(51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C07H 19/067, 19/167

(21) 国際出願番号: PCT/JP2005/003459

(22) 国際出願日: 2005 年 3 月 2 日 (02.03.2005)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願 2004-060261 2004 年 3 月 4 日 (04.03.2004) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立  
行政法人科学技術振興機構 (JAPAN SCIENCE AND  
TECHNOLOGY AGENCY) [JP/JP]; 〒3320012 埼玉県  
川口市本町四丁目 1 番 8 号 Saitama (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 関根 光雄  
(SEKINE, Mitsuo) [JP/JP]; 〒2250011 神奈川県横浜  
市青葉区あざみ野 1-2 6-4 6 Kanagawa (JP). 清  
尾 康志 (SEIO, Kohji) [JP/JP]; 〒2270054 神奈川県

青葉区しらとり台 4 8-5 第 2 パークサイド内  
田 1 0 2 Kanagawa (JP). 実吉 尚郎 (SANEYOSHI,  
Hisao) [JP/JP]; 〒2270051 神奈川県横浜市青葉区千草  
台 1 0-2 0 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 阿部 正博 (ABE, Masahiro); 〒2740825 千葉  
県船橋市前原西二丁目 1 4 番 1 号ダイアパレス津田  
沼 1 0 0 1 号 Chiba (JP).

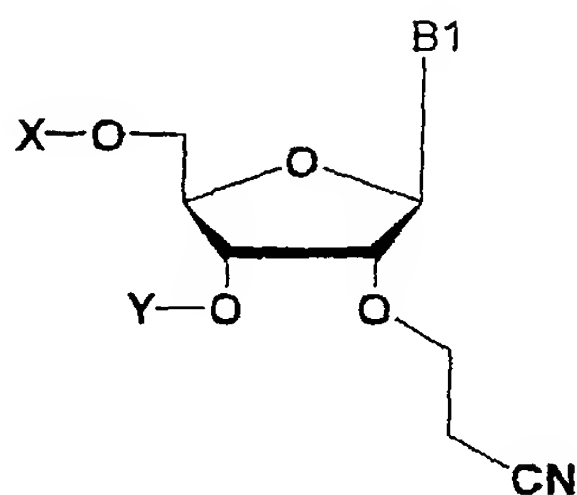
(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が  
可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,  
BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,  
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,  
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA,  
NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,  
SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,  
US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護  
が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA,  
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ,  
BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE,  
BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU,

[続葉有]

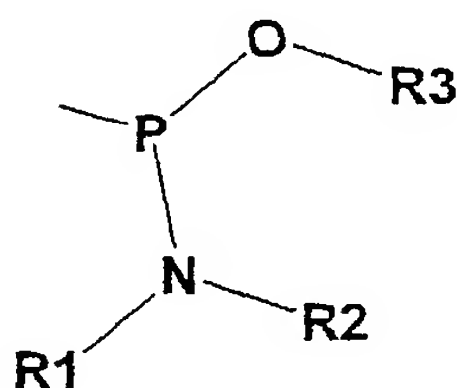
(54) Title: NOVEL ARTIFICIAL RNA<sub>6</sub>S MODIFIED AT THE 2'-HYDROXYL GROUP

(54) 発明の名称: 2 '水酸基を修飾された新規人工 RNA



(I)

(57) Abstract: The invention aims at developing a system for constructing cyanoethyl ethers efficiently under mild conditions and probability of the ethers as functional groups for imparting specific functions and thus making a contribution to the creation of novel functional nucleic acids. The invention relates to nucleosides represented by the general formula (I) and nucleotides derived therefrom: (I) wherein X and Y are each independently hydrogen, optionally substituted silyl, 4-methoxytrityl, 4,4'-dimethoxytrityl, or a group represented by the general formula (II); (II) (wherein R1 and R2 are each independently alkyl having 1 to 7 carbon atoms or R1 and R2 are united to form a ring structure; and R3 is a protective group for phosphoric acid); and B1 is an optionally substituted pyrimidine or purine base.



(II)

[続葉有]

WO 2005/085271 A1



IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),  
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,  
MR, NE, SN, TD, TG).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

添付公開書類：  
— 国際調査報告書

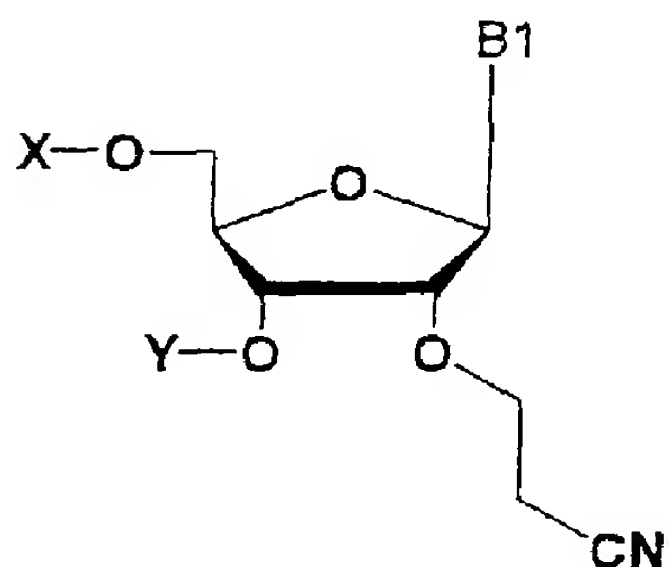
(57) 要約:

【要約】

本発明の目的は、穏やかな条件で効率的にシアノエチルエーテルを構築する系、及び機能性  
官能基としての可能性を開拓し新規機能性核酸の創製に寄与することである。

本発明は、一般式(I)で表されるヌクレオシドもしくはそのヌクレオチド・

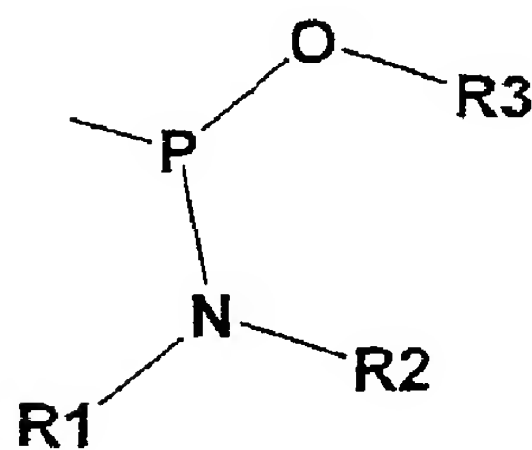
【化1】



(I)

(式I中、X及びYは同一または異なって、水素、置換基を有していてもよいシリル基、4-メトキシ  
シリル基、4, 4'-ジメトキシシリル基、又は一般式(II)：

【化2】



(II)

(式(II)中、R1およびR2は同一または異なって、炭素数1から7のアルキル基を表すか、又は、  
R1およびR2が互いに結合して環構造を形成し、R3はリン酸の保護基を表す)を表し、B1は置  
換基を有していてもよいピリミジン塩基又はプリン塩基を表す。)に関する。

## 明 細 書

### 2′水酸基を修飾された新規人工RNA

#### 技術分野

- [0001] 本発明は、2′水酸基をシアノエチルエーテル化したヌクレオシド、ヌクレオチド及びそれらのホスホロアミダイト化合物に関する。これらの化合物は、核酸合成試薬としてまた修飾RNAとして各々用いることができる。

#### 背景技術

- [0002] 化学的に合成されたオリゴリボヌクレオチド(オリゴRNA)は、遺伝子解析用のRNAプローブ、RNA医薬品素材(アンチセンスRNA、リボザイム、iRNAを利用した遺伝子発現制御)、人工酵素、アプタマーとして利用することが可能である。
- [0003] 2′水酸基をメチルエーテル誘導体は市販されていることもあり、エーテル修飾体として汎用されている。しかしながらこの修飾RNAでは、遺伝子制御物質として用いる場合細胞内における酵素耐性の点で問題がある。一方、同様のエーテル型修飾としてメキシエチルエーテル誘導体も汎用されている。これらの化合物は、メチル修飾体と比較して酵素耐性の点で優れていると報告されている(非特許文献1)。しかし、それらの調製には、導入法や導入試薬に制限がつくためピリミジンヌクレオシド、プリンヌクレオシドに共通な合成法がないのが現状である。また、エーテル鎖中に存在する酸素原子の影響によりエーテル鎖の構造が制限されているためオリゴRNA合成の際、縮合効率の点で問題が生じる可能性が十分考えられる。
- [0004] これらの問題点を解決するには、炭素数が3炭素程度でエーテル鎖中に酸素原子を含まず末端に電子吸引性でかつ親水性置換を有するエーテル修飾体の開発を行うことが有用である。
- [0005] 非特許文献1: VonPierre Martin, ヘルベチカ チミカ アクタ, 1995, 78, 486-504

#### 発明の開示

#### 発明が解決しようとする課題

- [0006] 上記のような条件を満たすエーテル修飾体としてシアノエチルエーテルが考えられる。このエーテルはアクリロニトリルを導入試薬とすることで安価に修飾体が得られると

いう利点がある。しかし、導入には強塩基例えば水酸化ナトリウムなどを用いて加熱という過酷な条件を要する問題点があった。また、機能性官能基としての可能性は核酸化学において開拓されていない。

[0007] 本発明は、穏やかな条件で効率的にシアノエチルエーテルを構築する系、及び機能性官能基としての可能性を開拓し新規機能性核酸の創製に寄与することを目的とする。

#### 課題を解決するための手段

[0008] そこで、本発明者は、アクリロニトリルを2-シアノエチル化の合成原料に用いるとともに、水酸基を活性化する塩基として最適なものを探索した結果、本発明を完成した。

[0009] 即ち、本発明は、一般式(I)で表されるヌクレオシド又はそのヌクレオチド(式I中、X及びYは同一または異なって、水素、置換基を有していてもよいシリル基、4-メトキシトリチル基、4,4'-ジメトキシトリチル基、又は一般式(II)(式(II)中、R1およびR2は同一または異なって、例えば、ジイソプロピルのような炭素数1から7のアルキル基を表すか、又は、R1およびR2が互いに結合して環構造を形成し、R3は、例えば、2-シアノエチルのようなリン酸の保護基を表す)を表し、B1は置換基を有していてもよいピリミジン塩基又はプリン塩基を表す。)に係る。

[0010] 更に、本発明は、上記一般式(I)で表されるヌクレオシドの合成方法であって、炭酸セシウム、DBU、及びTritonBから成る群から選択される少なくとも一種の化合物とアクリロニトリルとヌクレオシド誘導体を合成原料として用い、t-ブチルアルコールの存在下又は非存在下で、2'-水酸基をシアノエチルエーテル化することを特徴とする、前記合成方法に係る。

[0011] 本発明は又、これら合成方法で得られたヌクレオシドのホスホロアミダイト化合物にも係る。尚、本発明のホスホロアミダイト化合物は、当業者に公知のホスホロアミダイト法を用いて、当業者であれば容易に調製することが出来る。更に、本発明は上記ヌクレオシド(一般式(I)におけるX及びYを除いた部分)を含むRNAオリゴマーにも係る。

#### 発明の効果

[0012] 本発明のシアノエチル化反応により種々の水酸基のシアノエチル化を効率よく実施

することが可能となった。

### 図面の簡単な説明

- [0013] [図1]本発明で得られたRNAオリゴマーの陰イオン交換高速液体クロマトグラフィーによる分析プロファイルを示す。

### 発明を実施するための最良の形態

- [0014] 本発明化合物において、ピリミジン塩基又はプリン塩基であるB1の置換基の具体例としては、当業者に公知の任意の基、例えば、N-ジメチルアミノメチレン、N-アセチル、及びトリイソプロピルベンゼンスルホニル基等の本明細書の実施例中に記載されたものを挙げるができる。

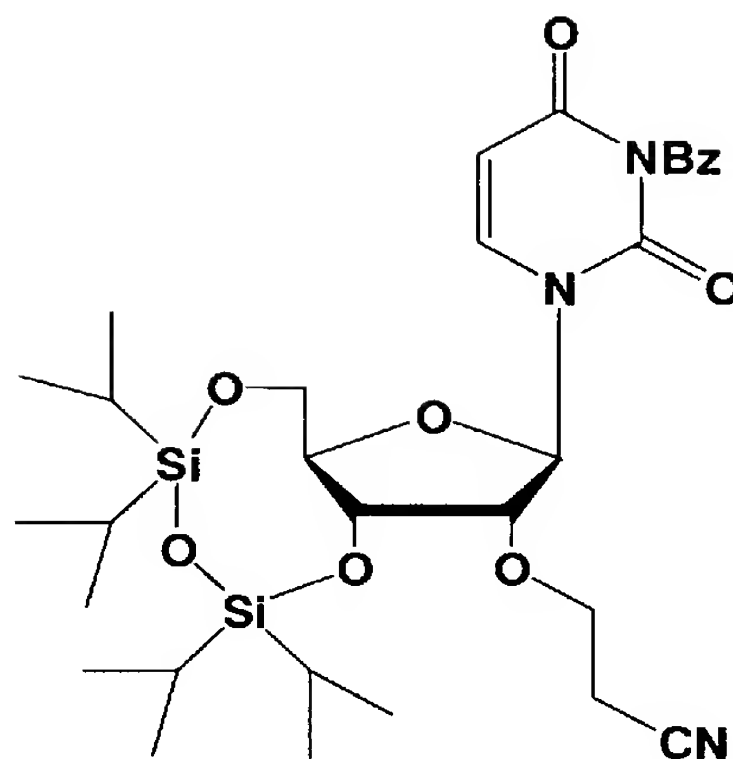
また、ホスホロアミダイト基(II)中、R1およびR2は同一または異なって、イソプロピル基等の炭素数1から7のアルキル基を表すか、又は、R1およびR2が互いに環構造を形成する。又、リン酸の保護基であるR3は、例えば、2-シアノエチル基、4-ニトロフェニルエチル基、N-(トリフロオロアセチル)アミノブチル基、又は、4-[N-メチル-N-(2, 2, 2-トリフルオロアセチル)アミノ]ブチル基を挙げることが出来、2-シアノエチル基が好適である。

- [0015] 本発明の合成方法において、炭酸セシウム、DBU、及びTritonBから成る群から選択される少なくとも一種の化合物、特に、好適には炭酸セシウムの存在下で、合成原料としてアクリロニトリル及びヌクレオシド誘導体を用いる合成方法であり、これら化合物はヌクレオシド誘導体に対して0.1〜30equivの範囲で反応系に存在させ、更に、アクリロニトリルに対して0.05〜30equivの範囲のt-ブチルアルコールの存在下に反応を行うことが好適である。通常、20℃〜30℃の温度範囲で反応させることが好ましく、又、反応時間は2時間〜3時間の範囲であることが好ましい。

### 実施例

- [0016] 以下、実施例に則して本発明を更に詳しく説明する。尚、本発明の技術的範囲はこれらの記載によって何等制限されるものではない。
- [0017] 実施例1: 2'-O-(2-シアノエチル)-N3-ベンゾイル-3', 5'-O-テトライソプロピルジシロキサニリデン-ウリジン(化合物1)

[0018] [化1]

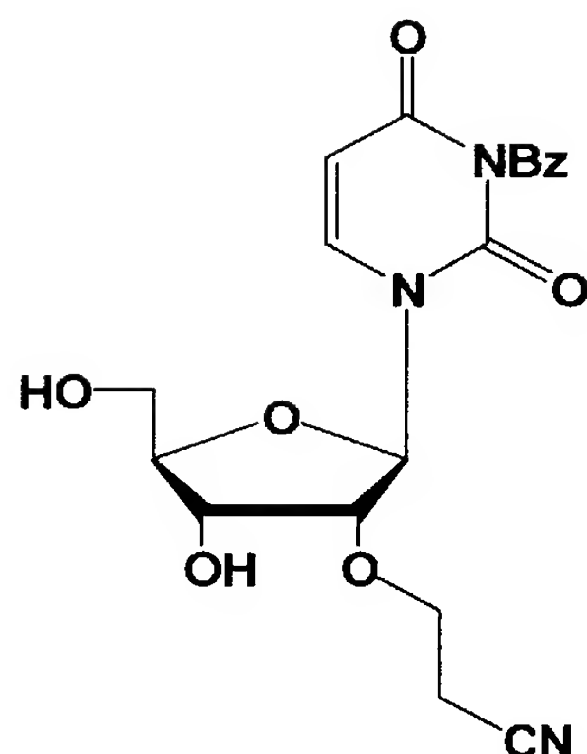


[0019] N3-ベンゾイル-3', 5'-O-テトライソプロピルジシロキサニリデン-ウリジン化合物 (591mg, 1mmol) を *t*-ブチルアルコール (5ml) に溶解させた。そこにアクリロニトリル (1.3ml, 20mmol)、引き続き炭酸セシウム (353mg, 1mmol) を加え2時間激しく攪拌した。その後、セライトろ過により炭酸セシウムを取り除き、減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン:酢酸エチル=3:1) により精製し白色結晶として標題化合物 (593mg, 0.921mmol) を収率92%で得た。分析用サンプルにはクロロホルム-ジイソプロピルエーテルから結晶化したものを用いた。m. p. 159°C。

[0020]  $^1\text{H-NMR}$  (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) 0.94-1.12 (28H, m), 2.61-2.63 (2H, m), 3.91-4.05 (4H, m), 4.18-4.29 (3H, m), 5.70 (1H, s), 5.79 (1H, d, J=8.30), 7.49-7.94 (5H, m), 8.00 (1H, d, J=8.30)

[0021] 実施例2 2'-O-(2-シアノエチル)-N3-ベンゾイルウリジン (化合物2)

[0022] [化2]



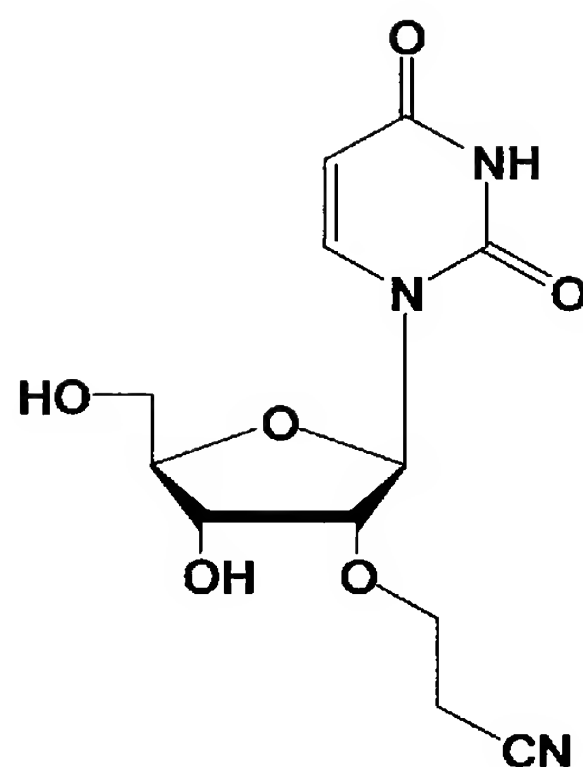
[0023] 得られた化合物1 (322mg, 0.545mmol)をテトラヒドロフラン(3ml)に溶解させ、あらかじめ調製したテトラブチルアンモニウムフルオリド(327mg, 1.25mmol)と酢酸(72  $\mu$ l, 1.25mmol)のテトラヒドロフラン溶液(2ml)をゆっくりと滴下した。1時間攪拌させた後、反応液をクロロホルムで希釈し飽和食塩水で3回洗浄した。有機層を分離後、水層をクロロホルムで抽出した。有機層を合わせて無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。乾燥剤をろ過後、減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(酢酸エチル:アセトン=10:1)により精製し白色泡状物質として標題化合物(147mg, 0.366mmol)を収率67%で得た。

[0024]  $^1\text{H-NMR}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)2.63-2.66(2H, m), 3.83-3.90(2H, m), 4.04-4.09(4H, m), 4.31(1H, dd,  $J=5.37, 7.32$ ), 5.81(1H, d,  $J=1.71$ ), 5.83(1H, d,  $J=8.30$ ), 7.50-7.94(5H, m), 8.10(1H, d,  $J=8.30$ )

[0025] 実施例3 2'-O-(2-シアノエチル)ウリジン(化合物3)



[0026] [化3]



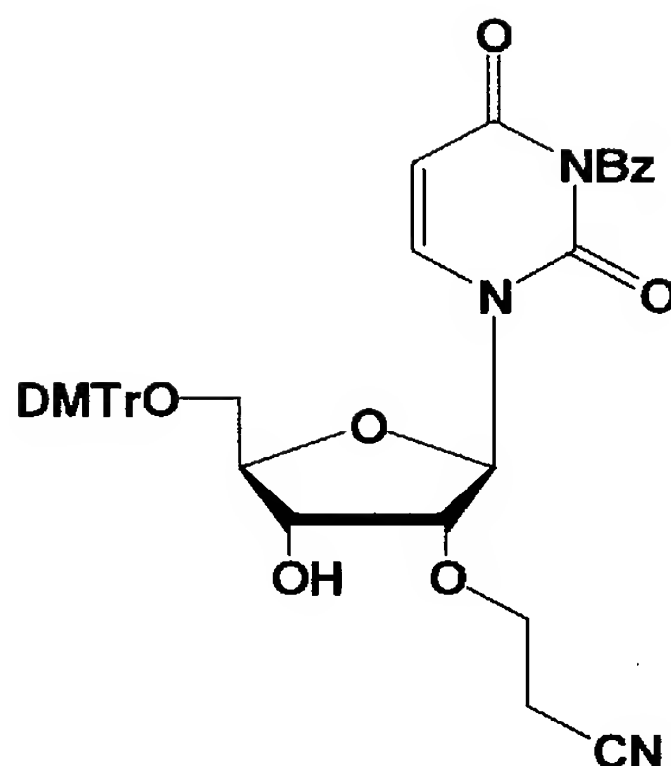
[0027] 得られた化合物2 (80mg, 0.202mmol)をエタノール:アンモニア水(2ml, 3:1, v/v)に溶解させ3時間攪拌した。その後、減圧濃縮して得られた残渣を1mlのメタノールに溶かし10mlのエーテルで希釈して3mlの蒸留水で3回抽出した。水層を減圧濃縮し、得られた残渣を球状シリカゲルカラムクロマトグラフィー(クロロホルム:メタノール=5:1)で精製し白色泡状物質として標題化合物(57mg, 0.191mmol)を収率95%で得た。

[0028]  $^1\text{H-NMR}$ ( $\text{D}_2\text{O}$ , 500 MHz)2.70-2.72(2H, m), 3.69(1H, dd,  $J=4.15, 12.9$  Hz), 3.82-3.85(3H, m), 4.02-4.04(1H, m), 4.08(1H, dd,  $J=3.66, 5.23$ ), 4.19(1H, t,  $J=5.62, 6.10$ ), 5.77(1H, d,  $J=8.06$ ), 5.87(1H, d,  $J=3.66$ ), 7.80(1H, d,  $J=8.06$ )

[0029] 実施例4 5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2'-O-(2-シアノエチル)-N3-ベンゾイルウリジン(化合物4)



[0030] [化4]



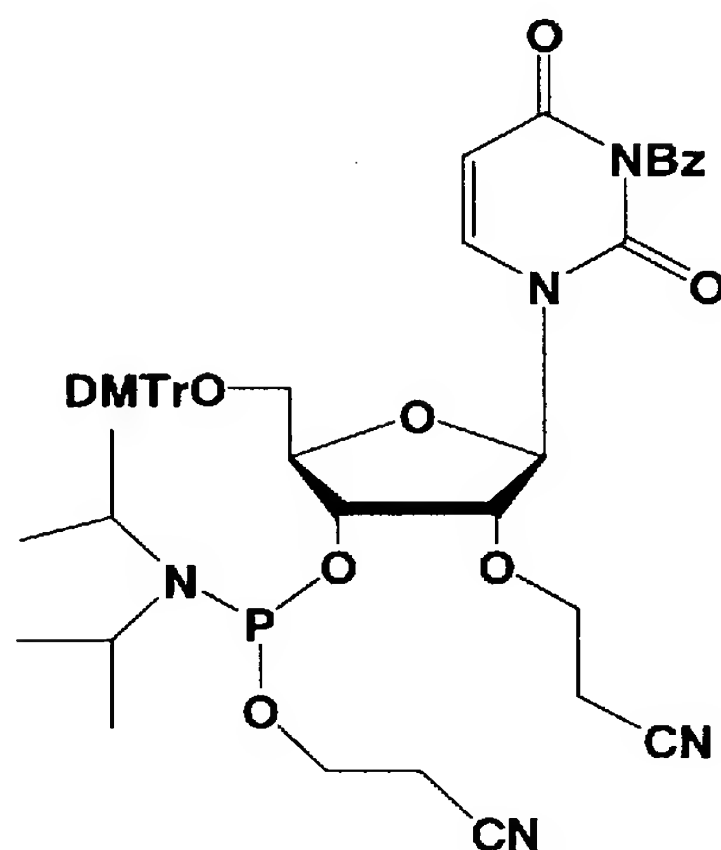
[0031] 化合物1 (2.70g, 4.19mmol) をテトラヒドロフラン (20ml) に溶解させ、あらかじめ調製したテトラブチルアンモニウムフルオリド (2.75g, 10.5mmol) と酢酸 (0.6ml, 10.5mmol) のテトラヒドロフラン溶液 (20ml) をゆっくりと滴下した。7時間攪拌させた後、反応液をクロロホルムで希釈し飽和食塩水で3回洗浄した。水層をクロロホルムで抽出し、有機層を合わせて無水硫酸ナトリウムで乾燥した。乾燥剤をろ過後、減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル: アセトン = 10:1) により精製し化合物2を得た。引き続き、乾燥ピリジンにて3回共沸脱水を行い、乾燥ピリジン (40ml) に溶解させた。塩化ジメトキシトリチル (1.71g, 5.04mmol) を加えて7時間攪拌させた後、反応系に水を加えて反応を停止した。減圧濃縮して得られた残渣をクロロホルムで希釈し、飽和重曹水及び飽和食塩水で洗浄した。得られた有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。乾燥剤をろ過後、減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン: 酢酸エチル = 1:1) で精製し白色泡状物質として標題化合物 (2.07g, 2.84mmol) を収率70%で得た。

[0032]  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) 2.55-2.62 (3H, m), 3.57-3.64 (2H, m), 3.79-3.86 (7H, m), 4.00 (1H, d,  $J=5.13$ ), 4.04-4.07 (1H, m), 4.12-4.15 (1H, m), 4.53 (1H, ddd,  $J=5.13$ , 9.40, 9.52), 5.37 (1H, d,  $J=8.30$ ), 5.86 (1H, s), 6.86 (4H, dd,  $J=1.22$ , 8.79), 7.24-7.34 (7H, m), 7.42 (2H, br), 7.49 (2H, br), 7.64 (2H, br), 7.93 (2H, br), 8.22 (1H,

J=8.30)

[0033] 実施例5 5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2'-O-(2-シアノエチル)-N3-ベンゾイルウリジン (2-シアノエチル N, N-ジイソプロピルホスホロアミダイト) (化合物5)

[0034] [化5]



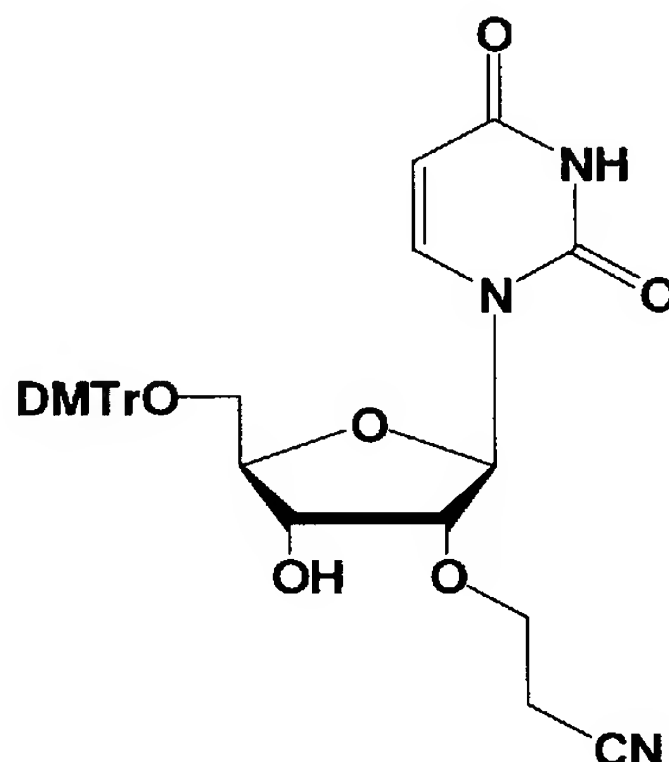
[0035] アルゴン雰囲気下、五酸化ニリンを乾燥剤としてデシケータにて減圧乾燥させた上記化合物4(1.06g, 1.51mmol)とテトラゾールジイソプロピルアンモニウム塩(193mg, 2.25mmol)を乾燥アセトニトリル(7ml)に溶解させた。2-シアノエチルN, N, N, N-テトライソプロピルホスホロジアミダイト(678mg, 2.25mmol)を乾燥アセトニトリル(3ml)の溶液として反応系に滴下した。5時間攪拌した後、反応液をクロロホルムで希釈し飽和食塩水で2回、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で2回洗浄した。水層をクロロホルムで抽出し、得られた有機層を合わせて無水硫酸マグネシウムで乾燥させた。乾燥剤をろ過後、減圧濃縮した。得られた残渣を球状シリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン:酢酸エチル=1:1 0.5%トリエチルアミン)で精製し白色泡状物質として標題化合物(1.27g, 1.40mmol)を収率93%で得た。

[0036]  $^1\text{H-NMR}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)1.08-1.30(12H, m), 2.47-2.68(4H, m), 3.49-4.30(16H, m), 4.59-4.80(1H, br), 5.28-5.37(1H, m), 5.85(1H, m), 6.83-6.91(4H, m), 7.24-

7.66(13H, m), 8.00-8.03( 2H, m), 8.24-8.30(1H, m)

[0037] 実施例6 5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2'-O-(2-シアノエチル)ウリジン(化合物6)

[0038] [化6]

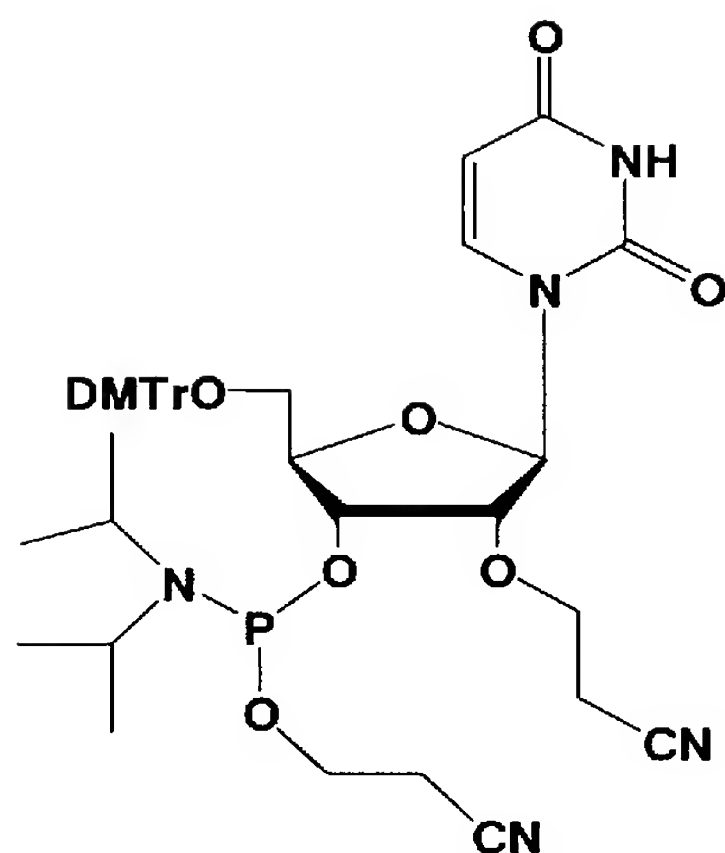


[0039] 2'-O-シアノエチルウリジン(化合物3)(1.97g, 6.63mmol)をピリジン(70ml)に溶解させ、ジメトキシトリチルクロリド(2.47g, 7.29mmol)を加え4時間攪拌する。その後、反応液を減圧濃縮してクロロホルムで希釈し飽和食塩水、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液にて洗浄し、得られた有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させる。減圧濃縮して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに吸着させクロロホルム:メタノール(100:0から20:1、含0.5%トリエチルアミン)で精製し標題化合物(3.91g, 99%)を得た。

[0040]  $^1\text{H-NMR}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)2.68-2.71(2H, m), 3.53-3.58(2H, m), 3.78-3.79(6H, m), 3.90-3.98(2H, m), 4.03-4.06(1H, m), 4.17-4.22(1H, m), 4.49(1H, dd), 5.31(1H, d), 5.89(1H, s), 6.84(4H, d), 7.22-7.40(9H, m),8.06(1H, d)

[0041] 実施例7 5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2'-O-(2-シアノエチル)ウリジン 3'-(2-シアノエチル N,N-ジイソプロピルホスホロアミダイト)(化合物7)

[0042] [化7]

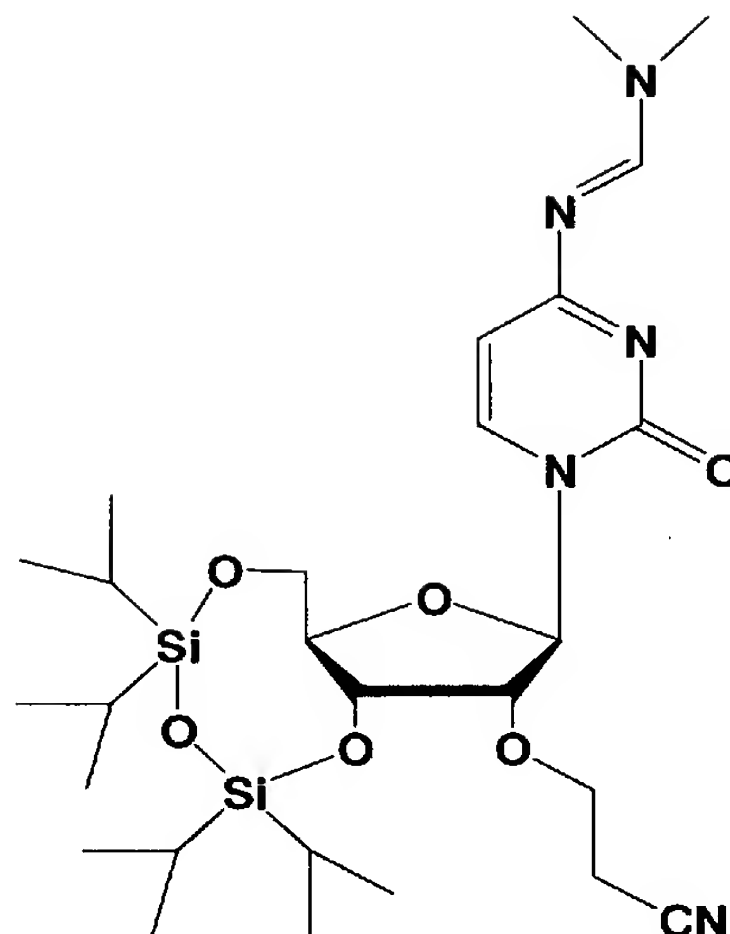


[0043] 上記化合物6 (1. 20g, 2. 00mmol)を脱水トルエンにて5回共沸脱水した後アルゴン置換した。乾燥ジクロロメタン(10ml)に溶解させ、ジイソプロピルエチルアミン(0. 5ml, 2. 87mmol)、2-シアノエチルN, N-ジイソプロピルアミノクロロホスフィン(521mg, 2. 20mmol)を乾燥ジクロロメタン(2ml)の溶液として反応系に滴下した。室温で2時間攪拌した後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で2回、飽和食塩水で2回洗浄した。得られた有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥させた。乾燥剤をろ過後、減圧濃縮した。得られた残渣をNHシリカゲルカラムクロマトグラフィーに吸着させクロロホルム:メタノール(100:0→50:1)で精製し標題化合物(1. 33g, 83%)を得た。

[0044]  $^1\text{H-NMR}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)1.08-1.21(12H, m), 2.60-2.77(4H, m), 3.43-3.76(4H, m), 3.79-3.80(6H, m), 3.87-4.84(6H, m), 5.18-5.29(1H, m), 5.88-5.90(1H, m), 6.81-6.87(4H, m), 7.23-7.39( 9H, m), .05-8.13(1H, m)

[0045] 実施例8 N4-ジメチルアミノメチレン-3', 5'-O-テトライソプロピルジシロキサニリデン-2'-O-(2-シアノエチル)シチジン(化合物8)

[0046] [化8]

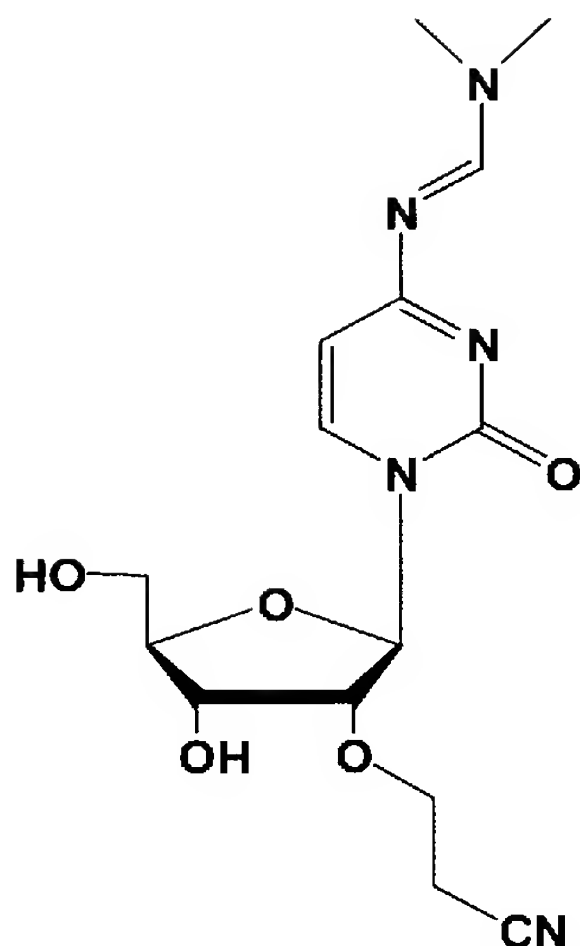


[0047] N4-ジメチルアミノメチレン-3', 5'-O-テトライソプロピルジシロキサニリデン-シチジン(541mg, 1mmol)をt-ブチルアルコール(5ml)に溶解させた。そこにアクリロニトリル(1.3ml, 20mmol)、引き続き炭酸セシウム(353mg, 1mmol)を加え3時間激しく攪拌した。その後、セライトろ過により炭酸セシウムを取り除き、減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに吸着させクロロホルム:メタノール(40:1)で精製し標題化合物(528mg、89%)を得た。

[0048]  $^1\text{H-NMR}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)0.85-1.06(28H, m), 2.69-2.73(2H, m), 3.10(3H, s), 3.12(3H, s), 3.86-4.24(7H,m), 5.74(1H, s), 6.01(1H, dd), 8.01(1H, d), 8.76(1H, s)

[0049] 実施例9 N4-ジメチルアミノメチレン-2'-O-(2-シアノエチル)シチジン(化合物9)

[0050] [化9]

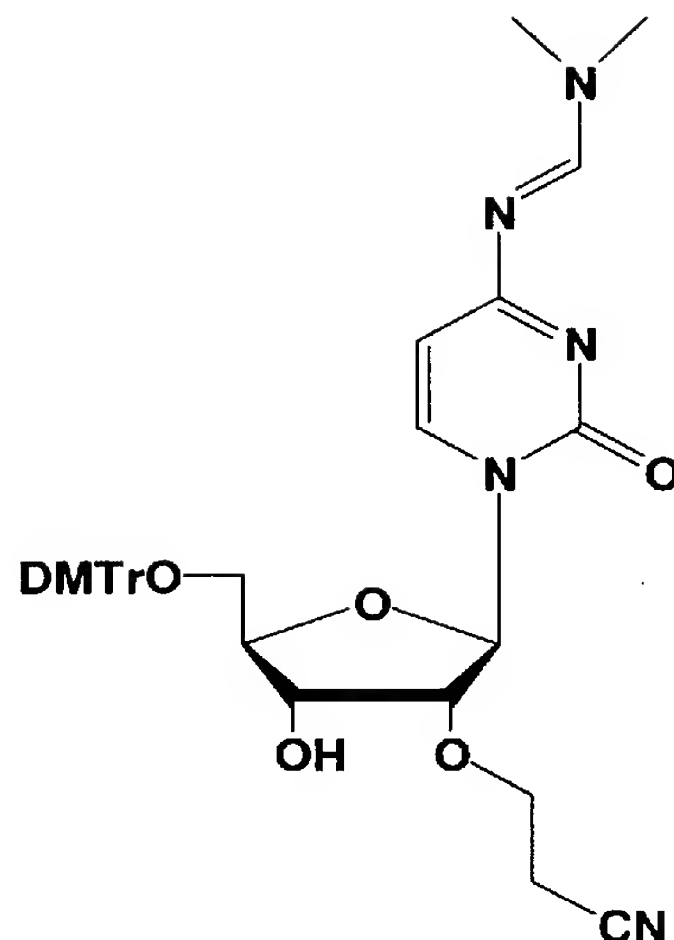


[0051] 得られた化合物8(347mg, 0.584mmol)をテトラヒドロフラン6ml)に溶解させた。そこにトリエチルアミン3フッ化水素(332 $\mu$ l, 2.04mmol)、引き続きトリエチルアミン(147 $\mu$ l, 1.05mmol)を加え1時間攪拌する。反応液を減圧濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに吸着させクロロホルム:メタノール(100:0から50:1)で標題化合物(184mg、90%)を得た。

[0052]  $^1\text{H-NMR}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)0.85-1.06(28H, m), 2.69-2.73(2H, m), 3.10(3H, s), 3.12(3H, s), 3.86-4.24(7H,m), 5.74(1H, vs), 6.01(1H, dd), 8.01(1H, d), 8.76(1H, s)

[0053] 実施例10 N4-ジメチルアミノメチレン-5'-O-ジメトキシトリチル-2'-O-シアノエチルシチジン(化合物10)

[0054] [化10]



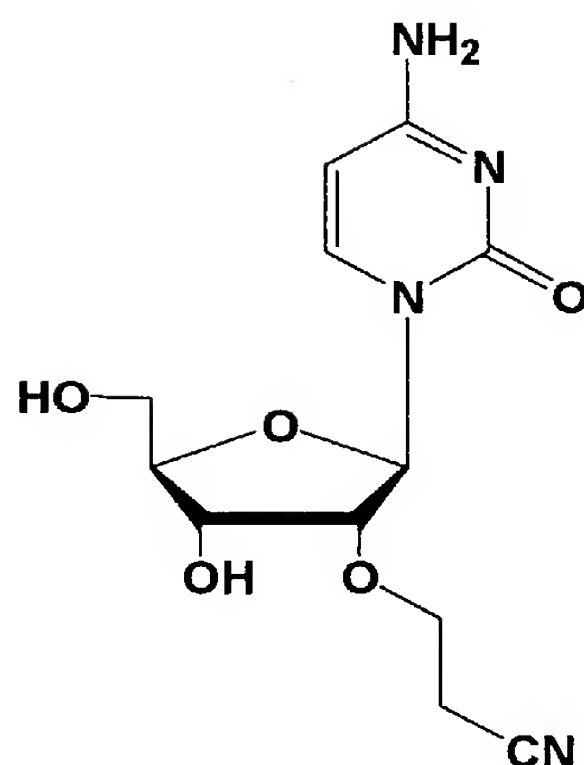
[0055] 化合物9(192mg, 0.546mmol)をピリジン(5ml)に溶解させた。そこにジメトキシトリチルクロリド(204mg, 0.602mmol)を加え2時間攪拌する。反応液を減圧濃縮し、クロロホルムで希釈し飽和食塩水並びに飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄した。さらに水層をクロロホルムで3回逆抽出し有機層とあわせて無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。乾燥剤をろ別した後、減圧濃縮し得られた残渣を得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに吸着させクロロホルム:メタノール(100:0から25:1)で精製し標題化合物(157mg, 45%)を得た。

[0056]  $^1\text{H-NMR}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)2.69-2.73(2H, br), 3.10(3H, s), 3.12(3H, s), 3.49(1H, dd), 3.57-3.59(1H, m), 3.77(6H, s), 3.94-4.07(3H, m), 4.31-4.41(2H, m), 5.76(1H, d), 5.93(1H, s), 6.82-6.85(4H, m), 7.20-7.43(9H, m), 8.16(1H, dd), 8.76(1H, s)

[0057] 実施例11 2'-O-(2-シアノエチル)シチジン(化合物11)



[0058] [化11]

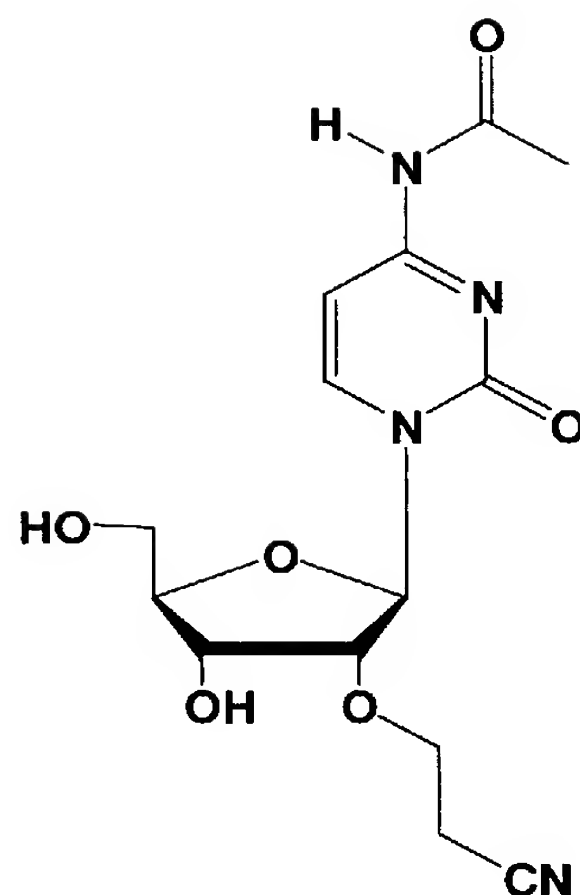


[0059] 化合物10(351mg、0.4mmol)を濃アンモニア水-エタノール(3:1,v/v、4ml)に溶解し、1時間攪拌する。反応液を減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに吸着させクロロホルム:メタノール(7:1)で精製し標題化合物(109mg, 92%)を得た。

[0060]  $^1\text{H}$ -NMR( $\text{D}_2\text{O}$ , 500 MHz)2.83-2.86(2H, m),3.84(1H,dd,  $J = 13 \text{ Hz}$ , 4.4 Hz), 3.95-4.03(3H, m), 4.14-4.18(2H, m), 4.27(1H, dd, $J=13 \text{ Hz}$ , 1.7 Hz), 5.97(1H, d,  $J = 3.2 \text{ Hz}$ ), 6.1(1H, d, $J=7.6 \text{ Hz}$ ), 7.89 (1H, d,  $J=7.6\text{Hz}$ ).

[0061] 実施例12 N4-アセチル-2'-O-(2-シアノエチル)シチジン(化合物12)

[0062] [化12]

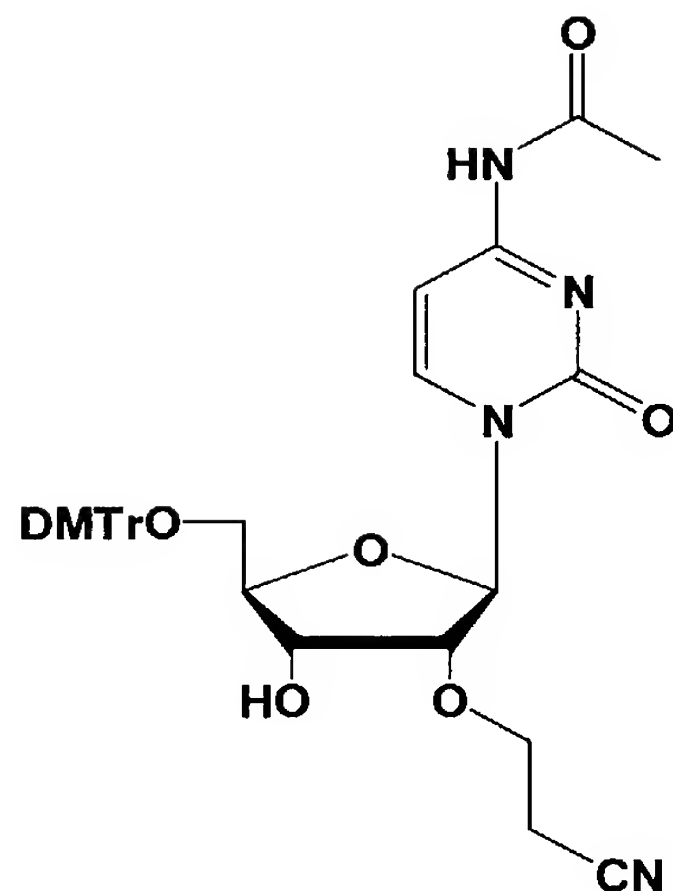


[0063] 化合物11(1000mg, 3.38mmol)をエタノール(70ml)に溶解させ、無水酢酸(1.6ml, 16.96mmol)を加えて12時間攪拌する。系内で析出した結晶をろ別し、ジエチルエーテルにて洗浄し標題化合物(1055mg, 3.12mmol)を92%の収率で得る。

[0064]  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO, 500 MHz) 2.10 (3H, s), 2.81–2.86 (2H, m), 3.60–3.63(1H, m), 3.78–3.94 (5H, m), 4.03–4.05 (1H, m), 5.13 (1H, d,  $J=4.88$ ), 5.20 (1H, t,  $J=4.88$ ), 5.78 (1H, d,  $J=1.71$ ), 7.18(d,  $J=7.57$ ), 8.47(1H,  $J=7.57$ ), 10.92(1H, s)

[0065] 実施例13 N4-アセチル-5'-O-ジメトキシトリチル-2'-O-(2-シアノエチル)シチジン (化合物13)

[0066] [化13]

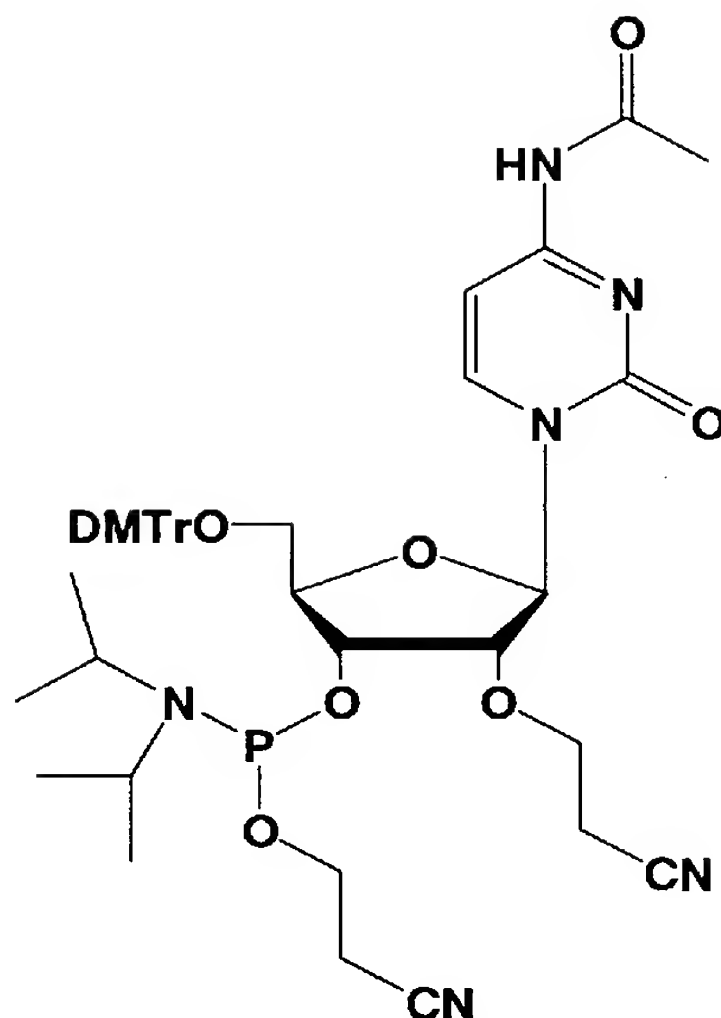


[0067] 化合物12(1055mg, 3.12mmol)を乾燥ピリジンにて4回共沸脱水させた後、乾燥ピリジン(30ml)に溶解させた。そこにジメトキシトリチルクロリド(1162mg, 3.43mmol)を加え3時間攪拌させ、水を加えて反応を停止する。反応液を減圧濃縮し、クロロホルムで希釈し飽和食塩水並びに飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄した。得られた有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。乾燥剤をろ別した後、減圧濃縮し得られた残渣を得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに吸着させクロロホルム:メタノール(98:2 0.5%トリエチルアミン)で精製し標題化合物(1848mg, 2.88mmol, 92%)を白色泡状物質として得る。

[0068]  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) 2.20 (3 H, s), 2.60–2.68 (2 H, m), 2.97–2.98 (1 H, br), 3.54–3.62 (2 H, m), 3.79 (6 H, m), 3.92–3.97 (1 H, m), 4.01(1H, d,  $J=5.13$ ), 4.11–4.13(1H, m), 4.24–4.18(1H, m), 5.89 (1 H, s), 6.85–6.87 (4 H, m), 7.15–7.43 (10 H, m), 8.53 (1H, d,  $J=7.57$ ), 10.00 (1H, br)

[0069] 実施例14 N4-アセチル-5'-O-ジメトキシトリチル-2'-O-(2-シアノエチル)シチジン 3'-(2-シアノエチル N, N-ジイソプロピルホスホロアミダイト) (化合物14)

[0070] [化14]



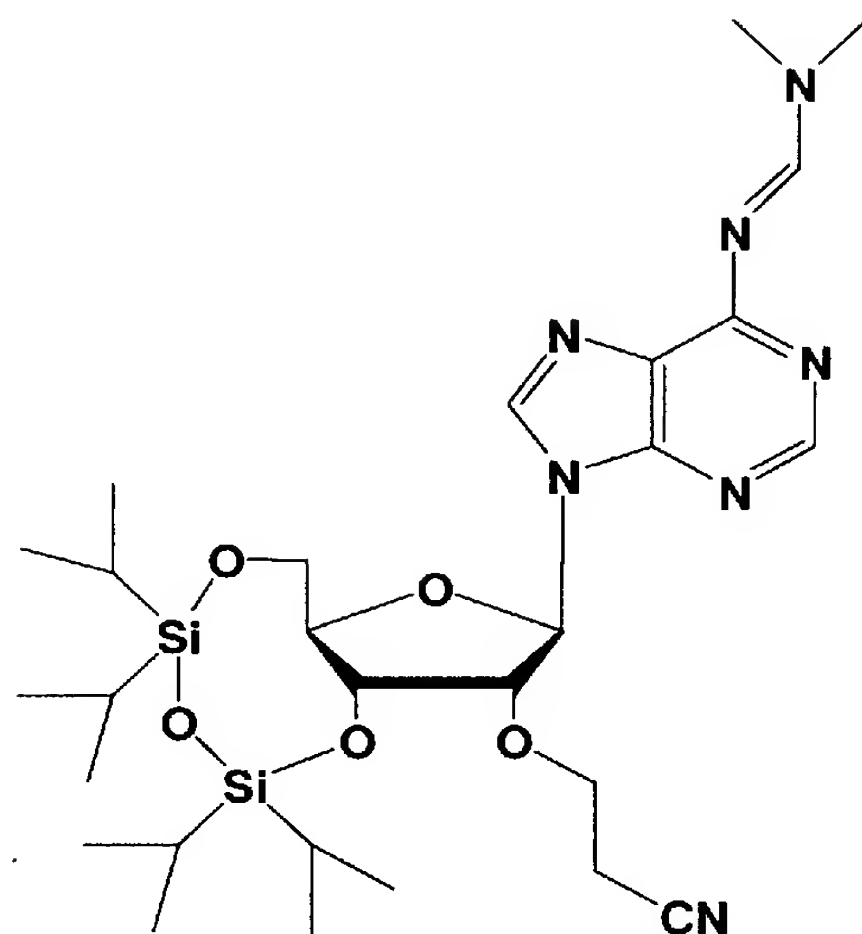
[0071] 上記化合物13(668 mg, 1.04 mmol) を乾燥トルエンにて5回共沸脱水を行った後、アルゴン置換した。乾燥ジクロロメタン(8 ml)に溶解させジイソプロピルエチルアミン(271  $\mu$ l, 1.56 mmol)を加え、ジイソプロピルアミノ-(2-シアノエチル)-クロロホスフィン(271 mg, 1.15 mmol) を乾燥ジクロロメタン(2 ml)の溶液として加えた。3時間攪拌した後、酢酸エチルで希釈し、飽和食塩水、飽和重曹水で有機層を洗浄した。得られた有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥して乾燥剤をろ別した。溶媒を減圧流去して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに吸着させクロロホルム:メタノール(98:2-97:3 0.5%トリエチルアミン)で精製し標題化合物(790 mg, 0.94 mmol, 90%)を白色泡状物質として得る。

[0072]  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) 1.01-1.18 (12 H, m), 2.23-2.24(3 H, m), 2.40-2.75(4 H, m), 3.45-3.74(5 H, m), 3.81-3.82(6 H, m), 3.84-4.59(6 H, m), 5.91-5.93(1 H, m), 6.83-6.87(4 H, m), 6.96-7.05(1 H, m), 7.26-7.44(9H, m), 8.53-8.60(1H,m), 10.10(1H,s)

[0073] 実施例15 N6-ジメチルアミノメチレン-3', 5'-O-テトライソプロピルジシロキサニリ

デン-2'-O-シアノエチルアデノシン(化合物15)

[0074] [化15]

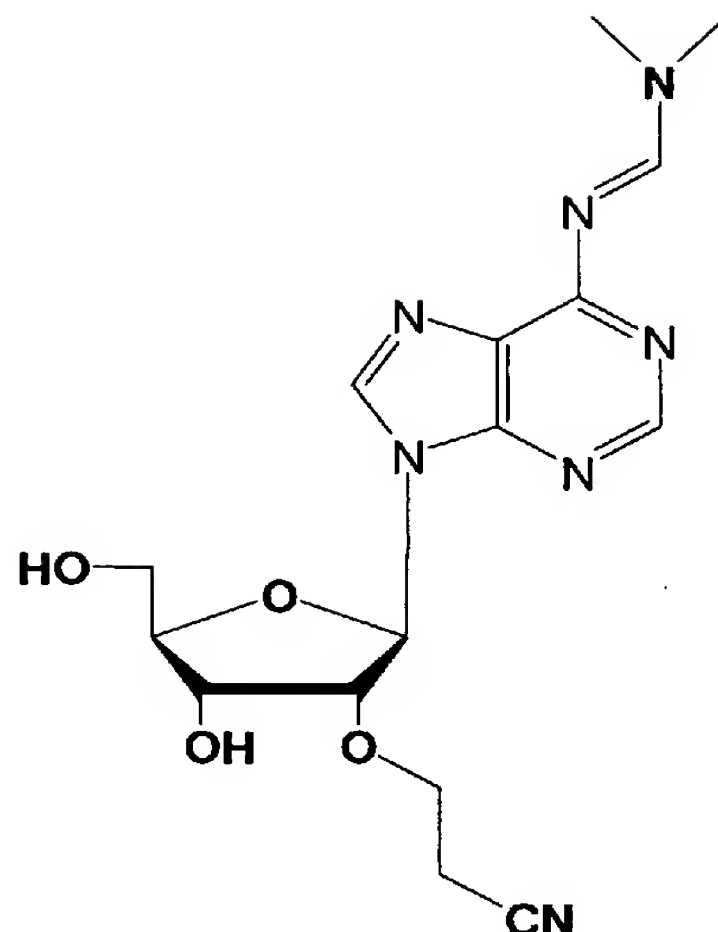


[0075] N6-ジメチルアミノメチレン-3', 5'-O-テトライソプロピルジシロキサニリデン-アデノシン化合物 (565mg, 1mmol) を *t*-ブチルアルコール (5ml) に溶解させた。そこに アクリロニトリル (1.3ml, 20mmol)、引き続き炭酸セシウム (353mg, 1mmol) を加え 3 時間激しく攪拌した。その後、セライトろ過により炭酸セシウムを取り除き、減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに吸着させクロロホルム:メタノール (50:1) で精製し標題化合物 (559mg, 90%) を得た。

[0076]  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) 0.96-1.12 (28H, m), 2.71-2.73 (2H, m), 3.19 (3H, s), 3.25 (3H, s), 3.94-4.27 (6H, m), 4.77 (1H, dd), 6.01 (1H, s), 8.14 (1H, s), 8.48 (1H, s), 8.93 (1H, s)

[0077] 実施例16 N6-ジメチルアミノメチレン-2'-O-シアノエチルアデノシン(化合物16)

[0078] [化16]

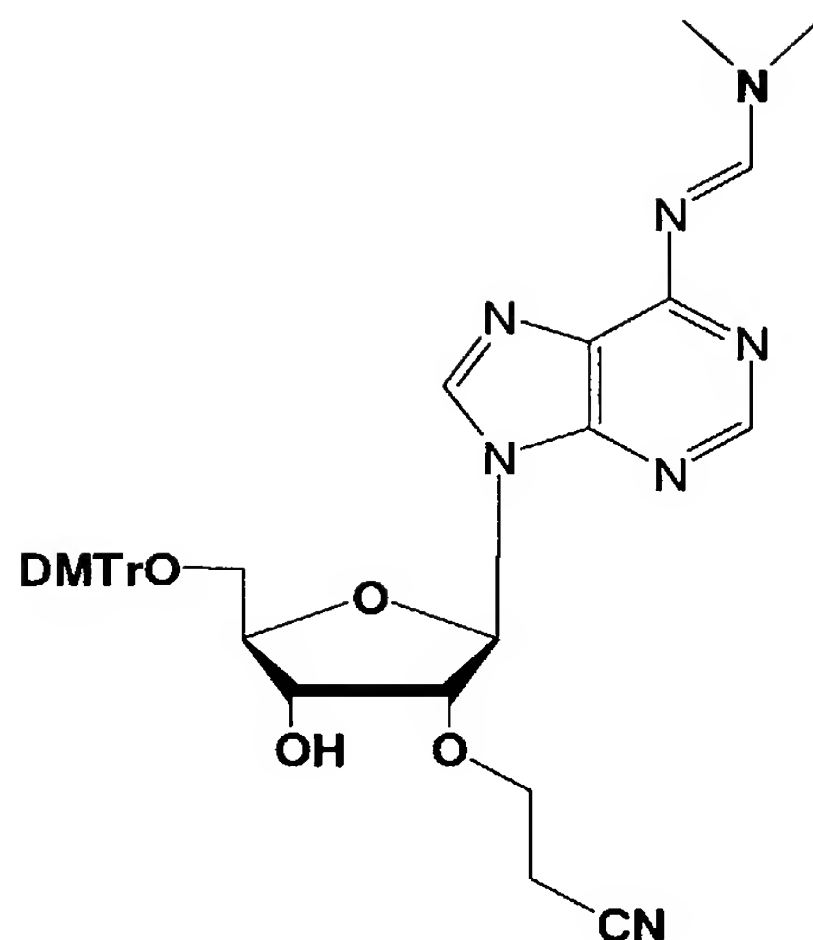


[0079] 得られた化合物15(1.45g, 2.35mmol)をテトラヒドロフラン24ml)に溶解させた。そこにトリエチルアミン3フッ化水素(1.3ml, 7.98mmol)、引き続きトリエチルアミン(589 $\mu$ l, 4.23mmol)を加え1時間攪拌する。反応液を減圧濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに吸着させクロロホルム:メタノール(50:1から25:1)で精製し標題化合物(878mg、quant)を得た。

[0080]  $^1\text{H-NMR}$ ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz)2.62-2.65(2H, m), 3.16(3H, s), 3.18(3H, s), 3.65-3.72(4H, m), 3.80-3.86(4H, m), 4.09-4.11(1H, m), 4.43(1H, t), 4.53 (1H, t), 6.08 (1H, d), 8.34 (1H, s), 8.40 (1H, s), 8.83 (1H, s)

[0081] 実施例17 N6-ジメチルアミノメチレン-5'-O-ジメトキシトリチル-2'-O-シアノエチルアデノシン(化合物17)

[0082] [化17]



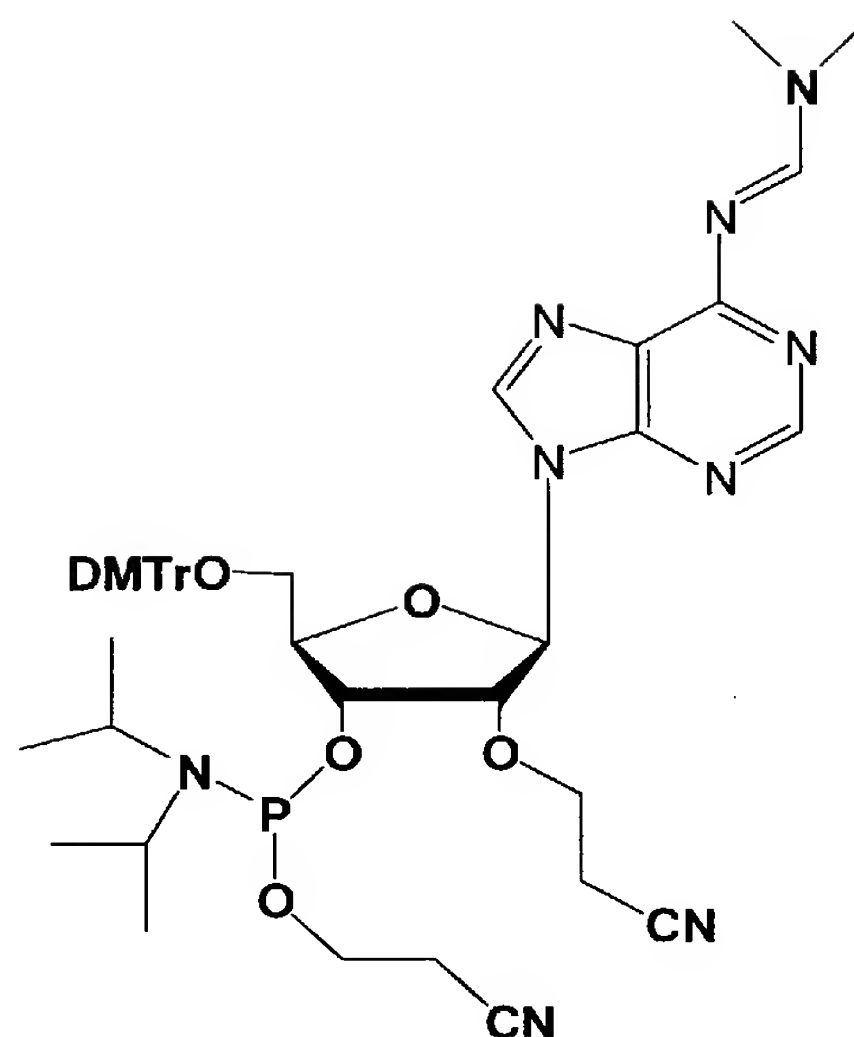
[0083] 化合物16(716mg, 1.91mmol)をピリジン(19ml)に溶解させた。そこにジメトキシトリチルクロリド(712mg, 2.10mmol)を加え3時間攪拌する。反応液を減圧濃縮し、クロロホルムで希釈し飽和食塩水並びに飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄した。さらに水層をクロロホルムで3回逆抽出し有機層とあわせて無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。乾燥剤をろ別した後、減圧濃縮し得られた残渣を得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに吸着させクロロホルム:メタノール(100:0から50:1含0.5%トリエチルアミン)で精製し標題化合物(1132mg, 87%)を得た。

[0084]  $^1\text{H-NMR}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)2.52-2.59(2H, m), 3.13(3H, s), 3.18(3H, s), 3.25-3.57(2H, m), 3.72(6H, s), 3.82-3.92(2H, m), 4.20-4.24(3H, m), 4.50(1H, t), 4.60(1H, dd), 6.14(1H, d), 6.75(4H, d), 7.13-7.47(9H, m), 8.09(1H, s), 8.43(1H, s), 8.94(1H, s)

[0085] 実施例18 N6-ジメチルアミノメチレン-5'-O-ジメトキシトリチル-2'-O-シアノエチルアデノシン 3'-(2-シアノエチル N,N-ジイソプロピルホスホロアミダイト)(化合物18)



[0086] [化18]



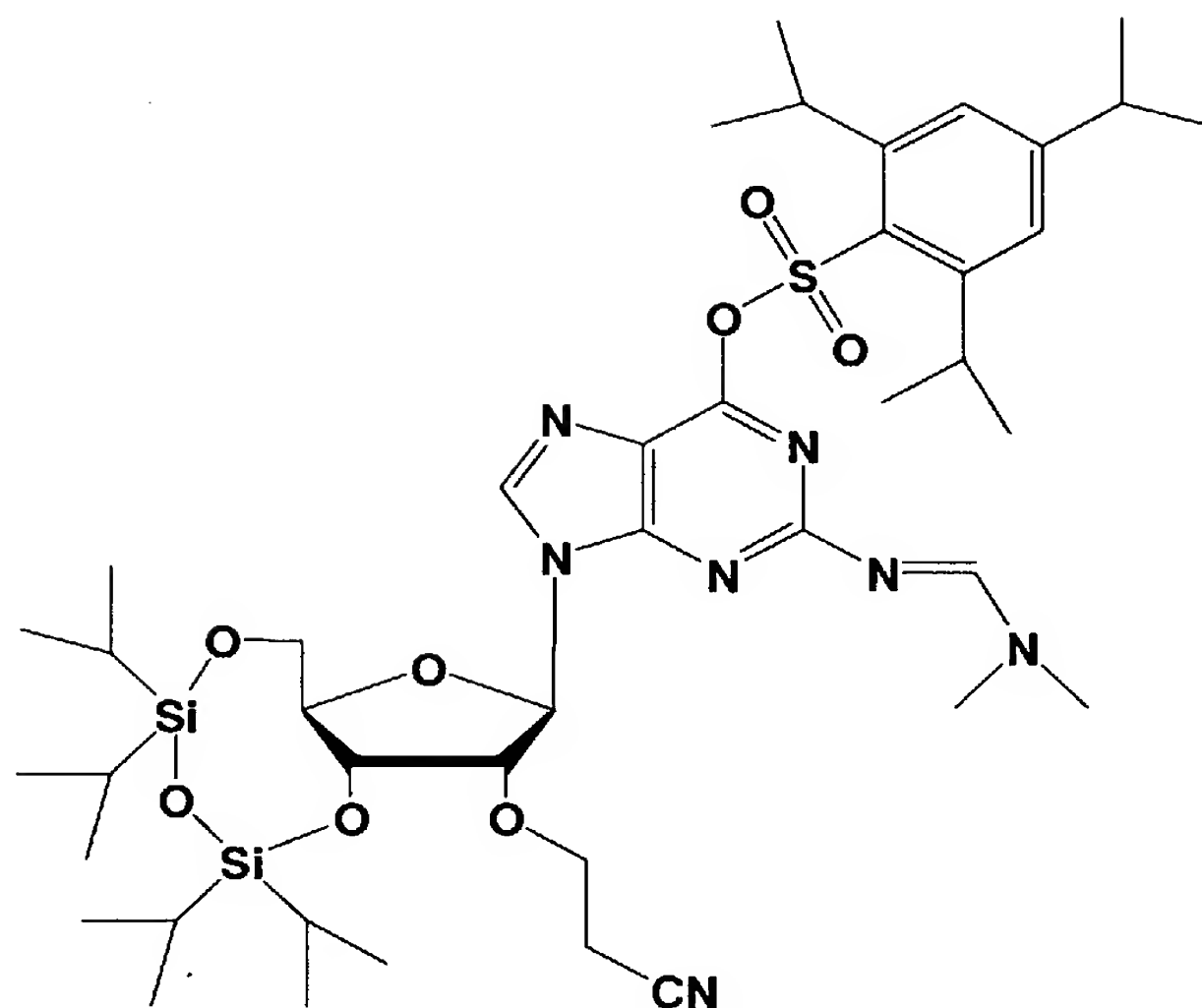
[0087] 上記化合物17(1.06g, 1.51mmol)を脱水トルエンにて5回共沸脱水した後アルゴン置換した。乾燥ジクロロメタン(12ml)に溶解させ、ジイソプロピルエチルアミン(0.3ml, 1.72mmol)、2-シアノエチルN, N-ジイソプロピルアミノクロロホスフィン(328mg, 1.36mmol)を乾燥ジクロロメタン(2ml)の溶液として反応系に滴下した。室温で2時間攪拌した後、反応液をクロロホルムで希釈し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で3回、飽和食塩水で1回洗浄した。得られた有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥させた。乾燥剤をろ過後、減圧濃縮した。得られた残渣をNHシリカゲルカラムクロマトグラフィーに吸着させクロロホルム:メタノール(100:0→100:1)で精製し標題化合物(896mg, 82%)を得た。

[0088]  $^1\text{H-NMR}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 500MHz)1.06-1.18(12H, m), 2.58-2.66(4H, m), 3.21(3H, s), 3.26(3H, s), 3.32-3.35(1H, m), 3.51-4.01(14H, m), 4.34-4.39(1H, m), 4.55-4.67(1H, m), 4.80-4.85(1H, m), 6.10-6.14(1H, m), 6.76-6.83(4H, t), 7.18-7.36(9H, m), 8.09-8.12(1H, m), 8.45-8.46(1H, m), 8.95-8.96(1H, m)

[0089] 実施例19 N2-ジメチルアミノメチレン-O-6-トリイソプロピルベンゼンスルホニル-3', 5'-O-テトライソプロピルジシロキサニリデン-2'-O-シアノエチルグアノシン(化合

物19)

[0090] [化19]

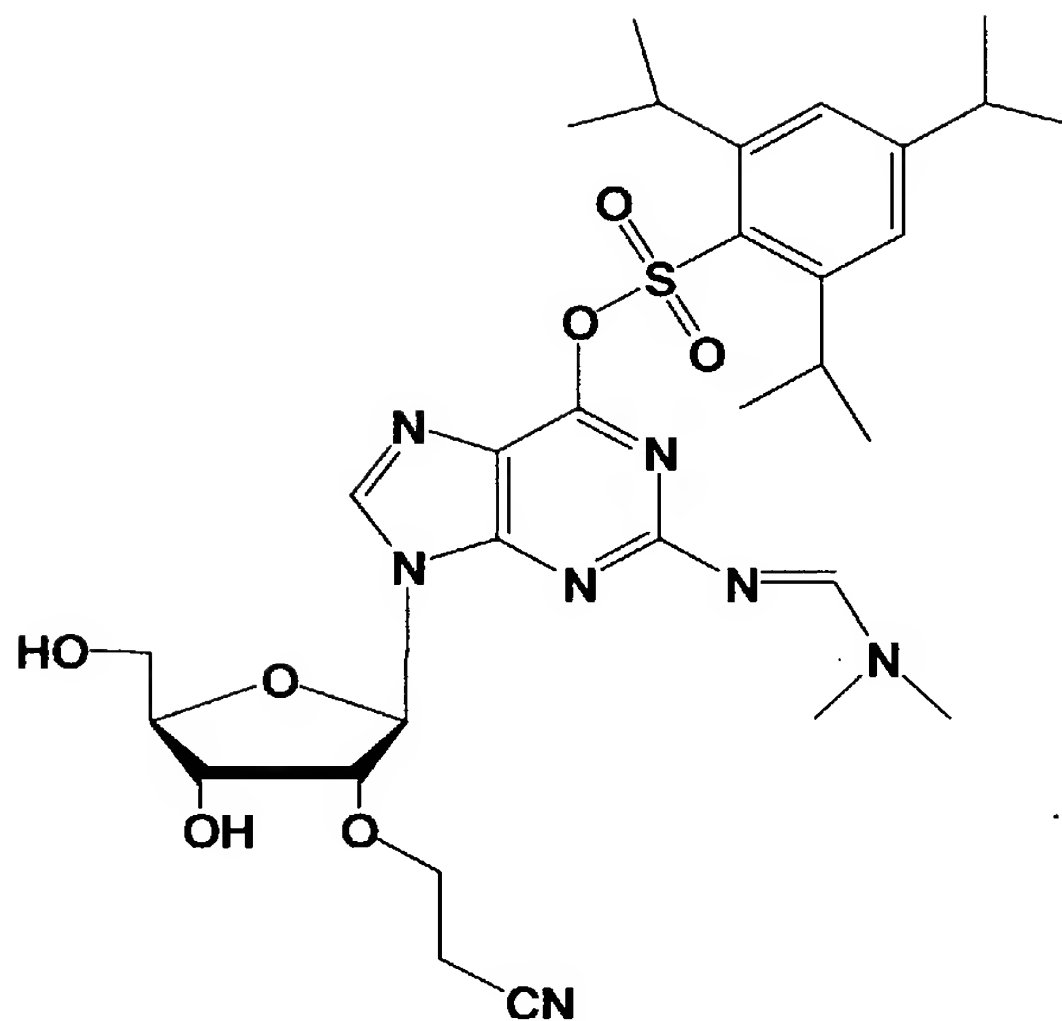


[0091] N2-ジメチルアミノメチレン-06-トリイソプロピルベンゼンスルホニル-3', 5'-O-テ  
トライソプロピルジシロキサニリデン-グアノシン (6. 60g, 7. 80mmol)をt-ブチルア  
ルコール(39ml)に溶解させた。そこにアクリロニトリル(20ml, 156mmol)、引き続  
き炭酸セシウム(2. 75g, 7. 80mmol)を加え2時間激しく攪拌した。その後、セライト  
ろ過により炭酸セシウムを取り除き、減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラム  
クロマトグラフィーに吸着させクロロホルム:メタノール(100:1)で精製し標題化合物(  
5. 82mg, 83%)を得た。

[0092]  $^1\text{H-NMR}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)0.99-1.34(46H, m), 2.77-2.63(2H, t), 2.95-  
2.97(1H, m), 3.11(3H, s), 3.16(3H, s), 3.99-4.33(9H, m), 4.57(1H, dd), 6.18(1H, s),  
7.23(2H, s), 8.04(1H, s), 8.23(1H, s)

[0093] 実施例20 N2-ジメチルアミノメチレン-6-O-トリイソプロピルベンゼンスルホニル-2'  
'-O-シアノエチルグアノシン(化合物20)

[0094] [化20]

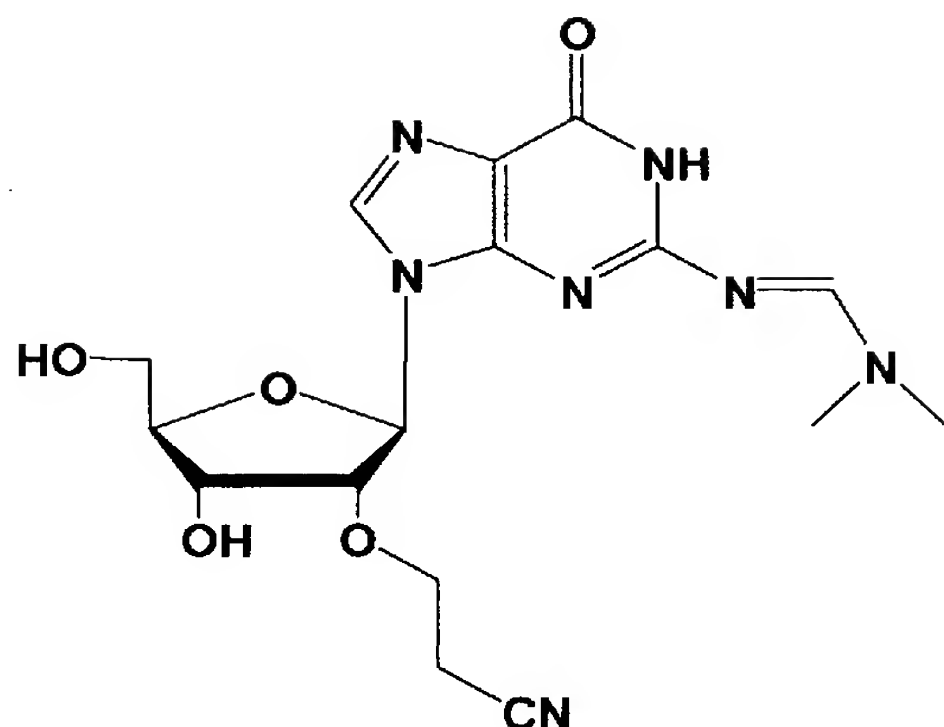


[0095] 化合物19(113mg, 0.126mmol)をテトラヒドロフラン(1ml)に溶解させた。そこにトリエチルアミン3フッ化水素(72  $\mu$ l, 0.442mmol)、引き続きトリエチルアミン(31  $\mu$ l, 0.226mmol)を加え1時間攪拌する。反応液を減圧濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに吸着させクロロホルム:メタノール(100:0から50:1から10:1)で精製し標題化合物(67mg, 81%)を得た。

[0096]  $^1\text{H-NMR}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) 1.22-1.31(18H, m), 2.57-2.60(2H, t), 2.81-2.96(1H, m), 3.05(3H, s), 3.12(3H, s), 3.62-3.79(3H, m), 3.93(1H, d), 4.24(2H, dt), 4.31(1H, br), 4.62(1H, m), 4.84(1H, dd), 5.98-6.15(2H, m), 7.23(2H, s), 8.12(1H, s), 8.20(1H, s)

[0097] 実施例21 N2-ジメチルアミノメチレン-2'-O-シアノエチルグアノシン(化合物21)

[0098] [化21]

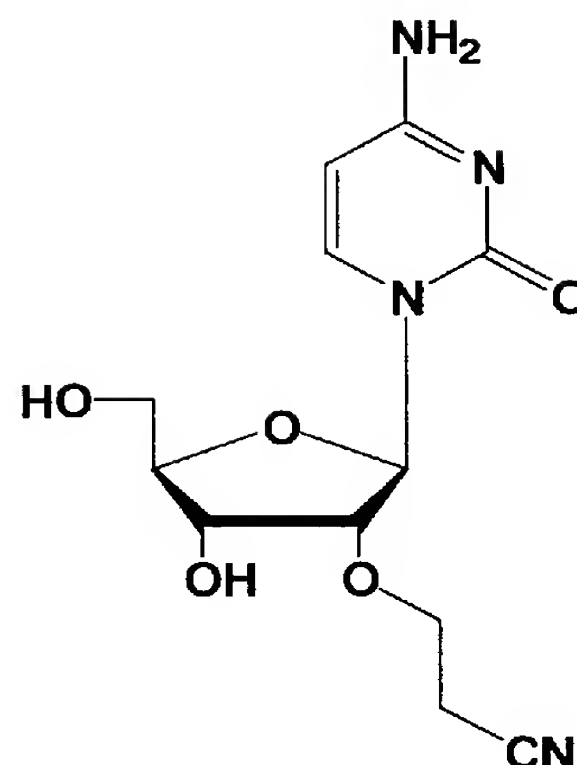


[0099] 化合物13(630 mg, 0.7 mmol) を無水アセトニトリル(7ml)に溶解させオルトニトロベンズアルドキシム(349 mg, 2.10 mmol),テトラメチルグアニジン(263  $\mu$ l, 2.10 mmol). を加える。1時間攪拌後、反応液を酢酸エチルで希釈し、飽和食塩水、飽和塩化アンモニウム水溶液で洗浄する。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、ろ過して有機溶媒を減圧留去する。得られた残渣を無水THF(7ml)に溶解させ、トリエチルアミン(172  $\mu$ l, 1.26mmol),トリエチルアミン3フッ化水素(399ml, 2.45mmol)を加えて、1時間攪拌する。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに吸着させクロロホルム:メタノール(90:10→85:15, v/v)で精製し標題化合物(218mg, 0.557 mmol, 80%)を白色固体として得る。

[0100]  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO, 500 MHz) 2.73–2.76 (2H, m), 3.03 (3H, s), 3.15 (3H, s), 3.54–3.58 (1H, m), 3.63–3.69(1H, m), 3.78–3.82 (1H, m), 3.91 (1H, q,  $J=3.91$ ), 4.29 (1H, q,  $J=4.39$ , 5.13), 4.40 (1H, t,  $J=5.13$ ), 5.01 (1H, t,  $J=5.61$ ), 5.30 (1H, d,  $J=5.37$ ), 5.91(1H, d,  $J=5.13$ ), 8.08 (1H, s), 8.55 (1H, s), 11.4 (1H, br)

[0101] 実施例22 2'-O-シアノエチルシチジン(化合物22)

[0102] [化22]

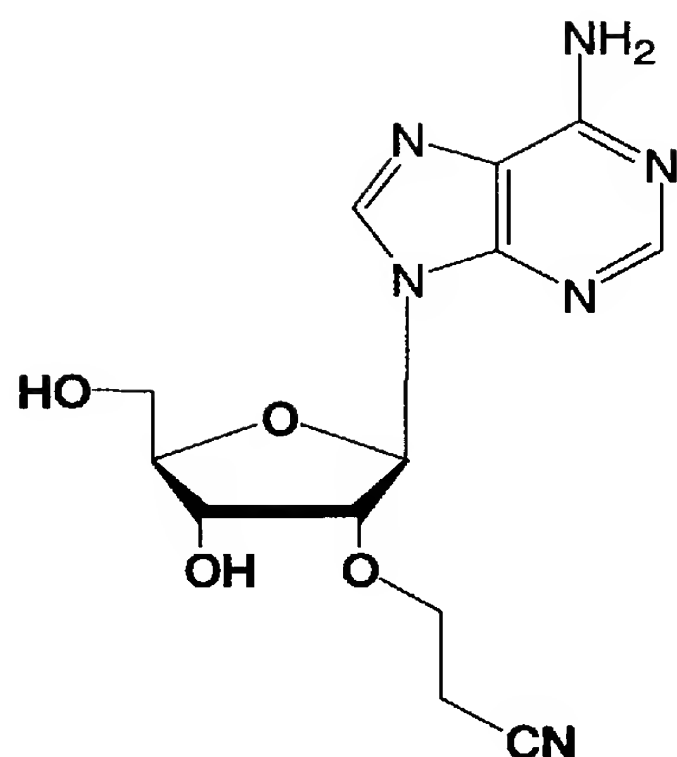


[0103] 化合物12 (141mg, 0.401mmol)をアンモニア水:エタノール(4ml, v/v=3/1)に溶解させ1時間攪拌する。反応液を減圧濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに吸着させクロロホルム:メタノール(7:1)で精製し標題化合物(109mg、92%)を得た。

[0104]  $^1\text{H-NMR}$ (D<sub>2</sub>O, 500 MHz)2.83-2.86(2H, m), 3.83(1H, dd), 3.95-4.03(3H, m), 4.14-4.18(2H, m), 4.28(1H, dd), 5.97(1H, d), 6.05(1H, dd), 7.88(1H, d)

[0105] 実施例23 2'-O-シアノエチルアデノシン(化合物23)

[0106] [化23]

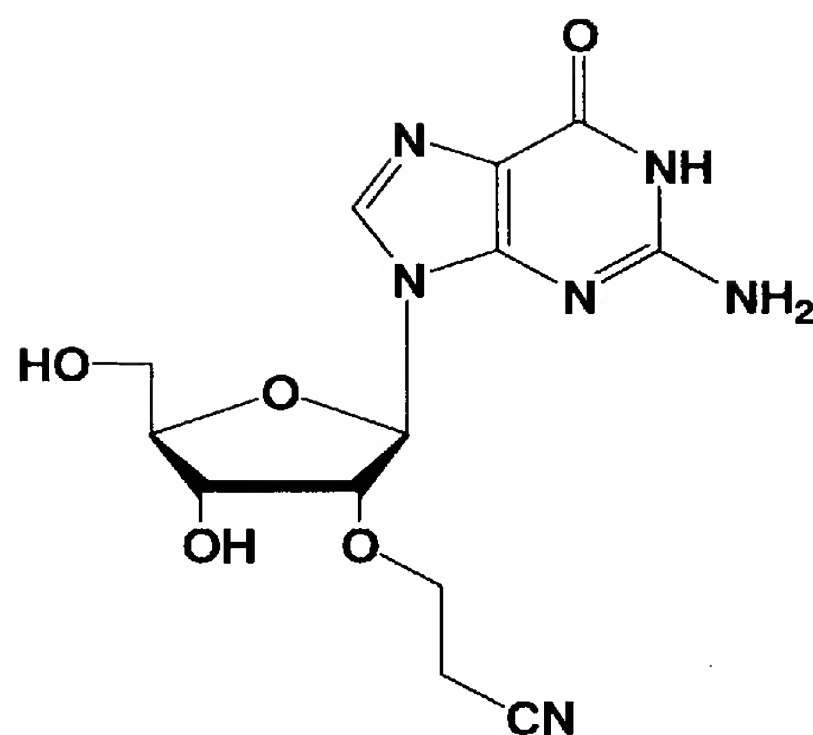


[0107] 化合物16 (475mg, 1.27mmol)をアセトニトリルに溶解させヒドラジン(218  $\mu$ l, 7mmol)を加えて3時間攪拌する。反応系に析出してきた粉体をイソプロピルアルコールで洗浄した。さらに炉液を減圧濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに吸着させクロロホルム:メタノール(100:0 $\rightarrow$ 50:1 $\rightarrow$ 10:1)で精製し先ほどの粉体とあわせて標題化合物(332mg、82%)を得た。

[0108]  $^1\text{H-NMR}$ (D<sub>2</sub>O, 500 MHz)2.83-2.86(2H, m), 3.83(1H, dd), 3.95-4.03(3H, m), 4.14-4.18(2H, m), 4.28(1H, dd), 5.97(1H, d), 6.05(1H, dd), 7.88(1H, d)

[0109] 実施例24 2'-O-シアノエチルグアノシン(化合物24)

[0110] [化24]



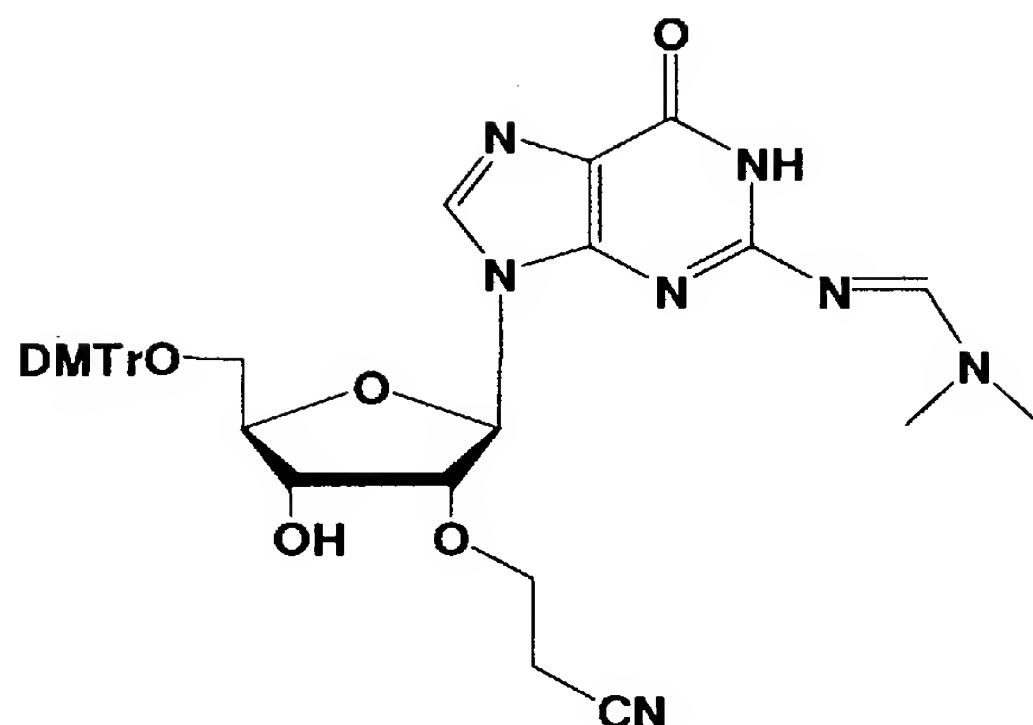
[0111] 化合物21 (447mg, 0.680mmol)をアセトニトリル7mlに溶解させオルトニトロベンズアルドオキシム(339mg, 7mmol)、テトラメチルグアニジン(85  $\mu$ l, 0.677mmol)を加えて1時間攪拌する。反応液を減圧濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに吸着させクロロホルム:メタノール(100:0 $\rightarrow$ 50:1 $\rightarrow$ 20:1 $\rightarrow$ 10:1)で精製する。得られた化合物をアンモニア水:エタノール(5ml, v/v=3:1)を加えて6時間攪拌する。反応液を減圧濃縮し50%エタノール溶液から結晶化し標題化合物(121mg, 53%)を得る。

[0112]  $^1\text{H-NMR}$ (D<sub>2</sub>O, 500 MHz)2.73(2H, t), 3.76-3.95(4H, m), 4.23(1H, q), 4.50(1H, dd), 4.52(1H,t), 5.98(1H, d), 8.04(1H, s)

[0113] 実施例25 2N-ジメチルアミノメチレン-5'-O-ジメトキシトリチル-2'-O-(2-シアノエチル)グアノシン(化合物25)



[0114] [化25]

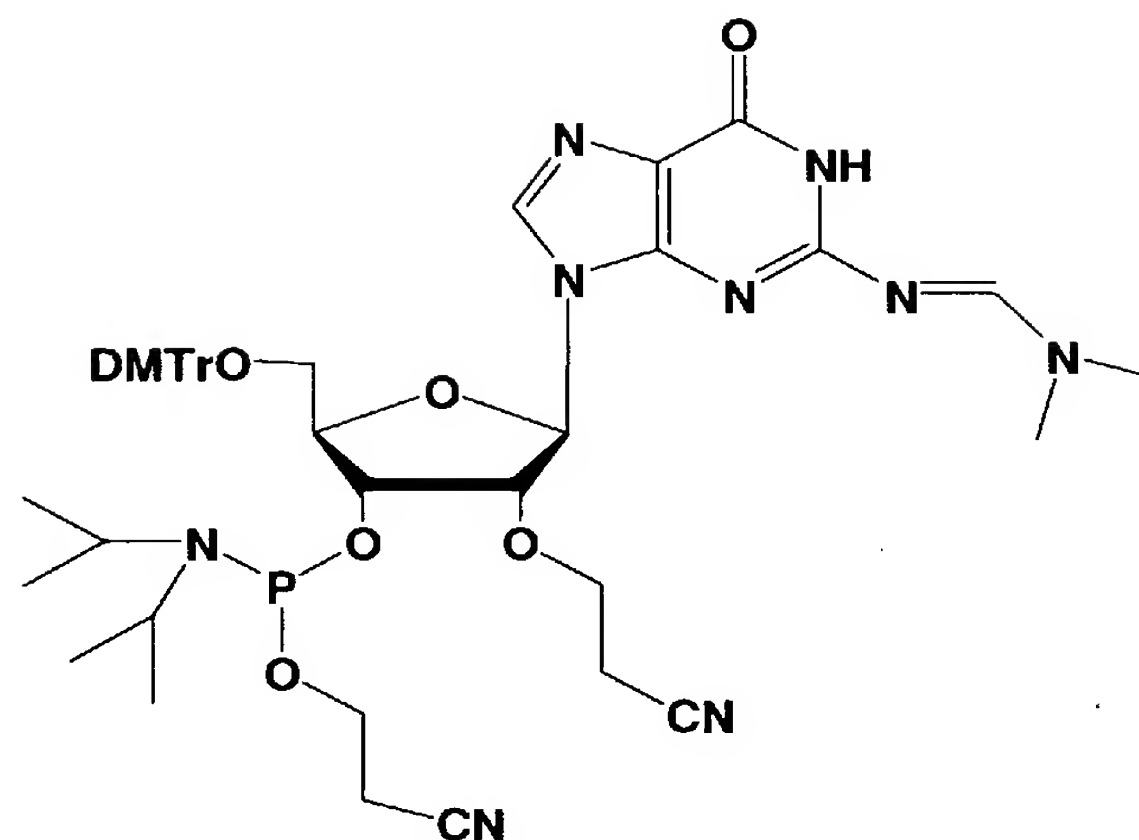


[0115] 化合物21 (392 mg, 1.00 mmol) 無水ピリジンにて4回共沸脱水を行い、無水ピリジン10mlに溶解させた。ジメトキシトリチルクロリド (373 mg, 1.10 mmol)を加えて室温で3時間攪拌する。水を加えて反応を停止し溶媒を減圧留去した。得られた残渣をクロロホルムで希釈し飽和食塩水ならびに飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させ溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに吸着させクロロホルム:メタノール (98:2, 0.5%トリエチルアミン)にて精製し、標題化合物 (635 mg, 0.92 mmol, 92 %) を白色泡状物として得る。

[0116]  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) 2.57–2.59 (2 H, m), 2.98(3 H, s), 3.04(3 H, s), 3.38(1 H, dd,  $J=4.64, 10.50$ ), 3.45–3.47(1 H, dd,  $J=2.44, 10.50$ ), 3.74(6 H, s), 3.78–3.96(3 H, m), 4.21–4.23(1 H, m), 4.29(1 H, dd,  $J=3.42, 8.55$ ), 4.59–4.60(1H, m), 6.09(1H, dd,  $J=3.42$ ), 6.10–6.78(4H, m), 7.13–7.41(9H, m), 7.74(1H, s), 8.54(1H, s), 10.01(1H, br)

[0117] 実施例26 2N-ジメチルアミノメチレン-5'-O-ジメトキシトリチル-2'-O-(2-シアノエチル)グアノシン 3'-(2-シアノエチル N,N-ジイソプロピルホスホロアミダイト) (化合物26)

[0118] [化26]



[0119] 化合物25 (1.95 g, 2.81 mmol) を無水トルエンにて3回共沸脱水を行い系内をアルゴン置換した。無水ジクロロメタン (26ml) に溶解させた後、ジイソプロピルエチルアミン (736  $\mu$ l, 1.56 mmol) を加え、ジイソプロピルアミノ-(2-シアノエチル)-クロロホスフィン (732 mg, 3.09 mmol) を無水ジクロロメタン (2 ml) の溶液として加えた。3時間攪拌した後、クロロホルムで希釈し、飽和食塩水並びに飽和炭酸水素ナトリウム水溶液にて洗浄する。得られた有機層を無水硫酸ナトリウムにて乾燥し、ろ別する。有機溶媒を減圧留去して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに吸着させクロロホルム:メタノール (98:2, 0.5% トリエチルアミン) にて精製し標題化合物 (2.11 g, 2.36 mmol, 84%) を白色泡状物質として得る。

[0120]  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) 1.01–1.24(12 H, m), 2.33–2.66(5 H, m), 3.07–3.10(6 H, m), 3.30–4.02(14 H, m), 4.29–4.35(2 H, m), 4.48–4.55(1 H, m), 6.09–6.12(1 H, m), 6.79–6.82(4 H, m), 7.17–7.44(10 H, m), 7.78–7.82(1 H, m), 8.57–8.60(1 H, m), 9.73–9.77(1 H, m)

[0121] 実施例27 2'-シアノエチルウリジル酸12量体の合成

常法により調整された、2'-O-シアノエチルウリジンがサクシニルリンカーを介して導入されているロングアミノアルキルチェーンCPG (16  $\mu$ mol/g) を1  $\mu$ mol固相合

成用ソケットに充填されたものを用い、2'-O-シアノエチルウリジンホスホロアミダイトユニット(化合物7)を0.1Mの無水アセトニトリルの溶液としてDNA/RNA自動合成機(Applied Bio System)に縮合時間10分間の縮合時間であるRNA合成用プログラムを適用する。

合成終了後、アンモニア水1mlにて20分間処理して固相担体からオリゴヌクレオチドを切り出しを行う。その後、酢酸アンモニウムバッファーで適当量希釈し、逆相カラムカートリッジ並びに陰イオン交換HPLCを用いて精製する。逆相カラムカートリッジにて脱塩操作を行い得られたオリゴヌクレオチドを凍結乾燥して標題化合物を得る。(収率21%)。陰イオン交換高速液体クロマトグラフィーによる分析プロファイルを図1Aに示す。

[0122] MALDI TOF MASS (negative) Calcd. 4245.66 Found 4244.33

[0123] 実施例28 GACUの混合配列を有する2'-O-シアノエチルRNA4量体の合成

常法により調整された2'-O-シアノエチルウリジンがサクシニルリンカーを介して導入されているロングアミノアルキルチェーンCPG(16  $\mu$ mol/g)を1  $\mu$ mol固相合成用ソケットに充填されたものを用い、各4種類の2'-O-シアノエチルヌクレオシドホスホロアミダイトユニット(化合物7、14、18、26)を0.1Mの無水アセトニトリルの溶液としてDNA/RNA自動合成機(Applied Bio System)に縮合時間10分間の縮合時間であるRNA合成用プログラムを適用する。

合成終了後、アンモニア水-酢酸アンモニウム(10%wt/wt)1mlにて90分間処理して固相担体からのオリゴヌクレオチドの切り出し並びに核酸塩基部の保護基の脱保護を行う。その後、酢酸アンモニウムバッファーで適当量希釈し、逆相カラムカートリッジ並びに陰イオン交換HPLCを用いて精製する。逆相カラムカートリッジを用いて脱塩操作を行い得られたオリゴヌクレオチドを凍結乾燥して標題化合物を得る(収率 58%)。陰イオン交換高速液体クロマトグラフィーによる分析プロファイルを図1Bに示す。

[0124] MALDI TOF MASS (negative) Calcd. 1434.31 Found 1434.12

[0125] 実施例29 GACUGACUGACUの混合配列を有する2'-O-シアノエチルRNA12量体の合成

常法により調整された2'-O-シアノエチルウリジンがサクシニルリンカーを介して導入されているロングアミノアルキルチェーンCPG ( $16 \mu\text{mol/g}$ ) を  $1 \mu\text{mol}$  固相合成用ソケットに充填されたものを用い、各4種類の2'-O-シアノエチルヌクレオシドホスホロアミダイトユニット(化合物7、14、18、26)を0.1Mの無水アセトニトリルの溶液としてDNA/RNA自動合成機(Applied Bio System)に縮合時間10分間の縮合時間であるRNA合成用プログラムを適用する。

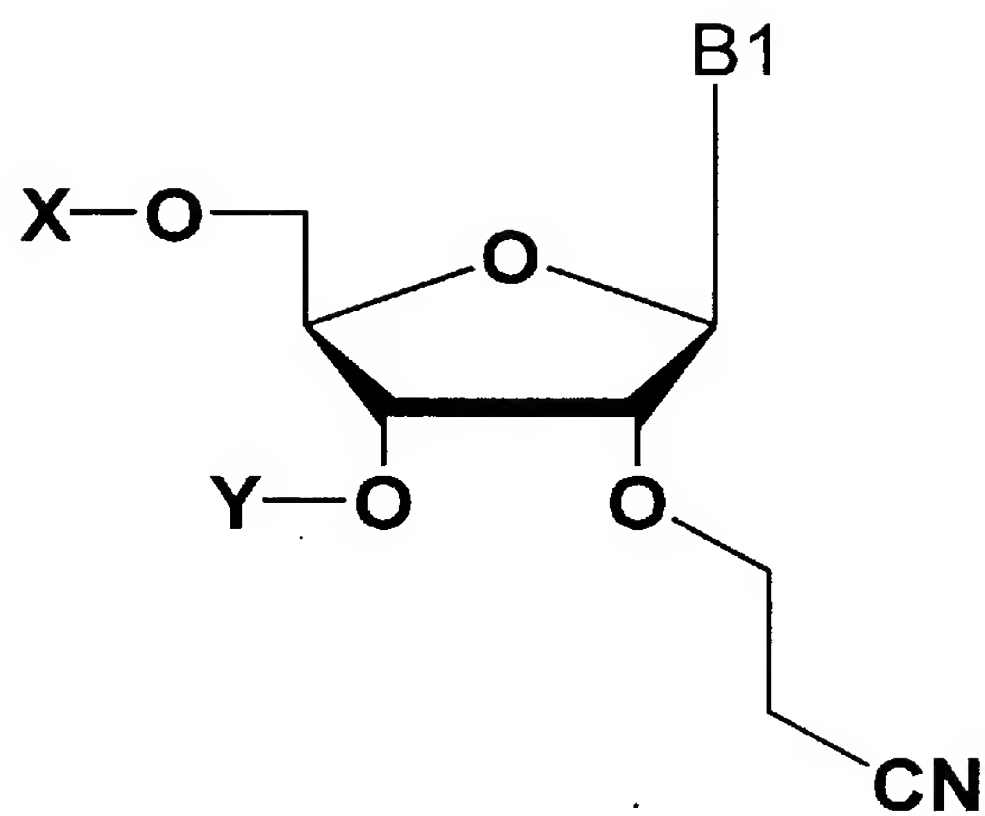
合成終了後、アンモニア水-酢酸アンモニウム(10%wt/wt) 1mlにて90分間処理して固相担体からのオリゴヌクレオチドの切り出し並びに核酸塩基部の保護基の脱保護を行う。その後、酢酸アンモニウムバッファーで適当量希釈し、逆相カラムカートリッジ並びに陰イオン交換HPLCを用いて精製する。逆相カラムカートリッジを用いて脱塩操作を行い得られたオリゴヌクレオチドを凍結乾燥して標題化合物を得る(収率6%)。陰イオン交換高速液体クロマトグラフィーによる分析プロファイルを図1Cに示す。

[0126] MALDI-TOF MASS(negative) Calcd. 4428.86 Found 4428.55

#### 産業上の利用可能性

[0127] 本発明の合成方法で得られる、一般式(I)で表されるヌクレオシドもしくはそのヌクレオチド:

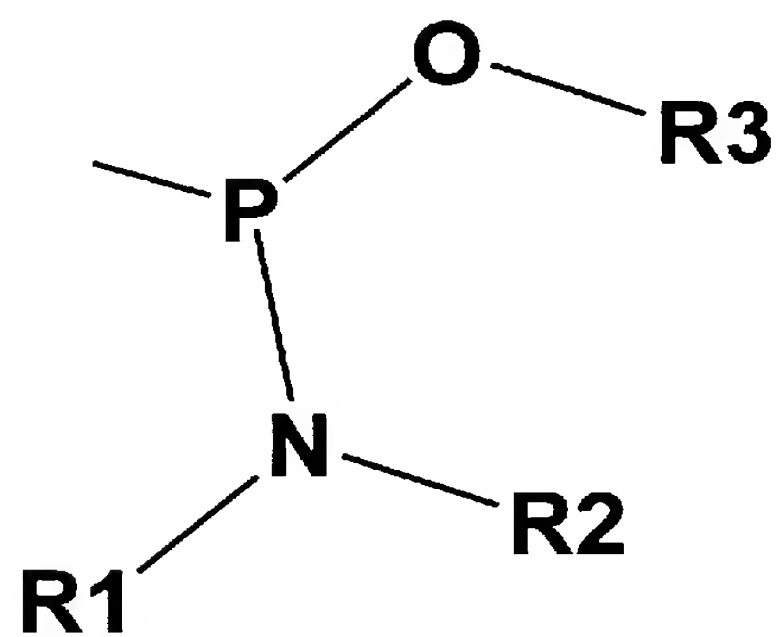
[0128] [化27]



(I)

[0129] (式I中、X及びYは同一または異なって、水素、置換基を有していてもよいシリル基、4-メトキシトリチル基、4, 4'-ジメトキシトリチル基、又は一般式(II)：

[0130] [化28]



(II)

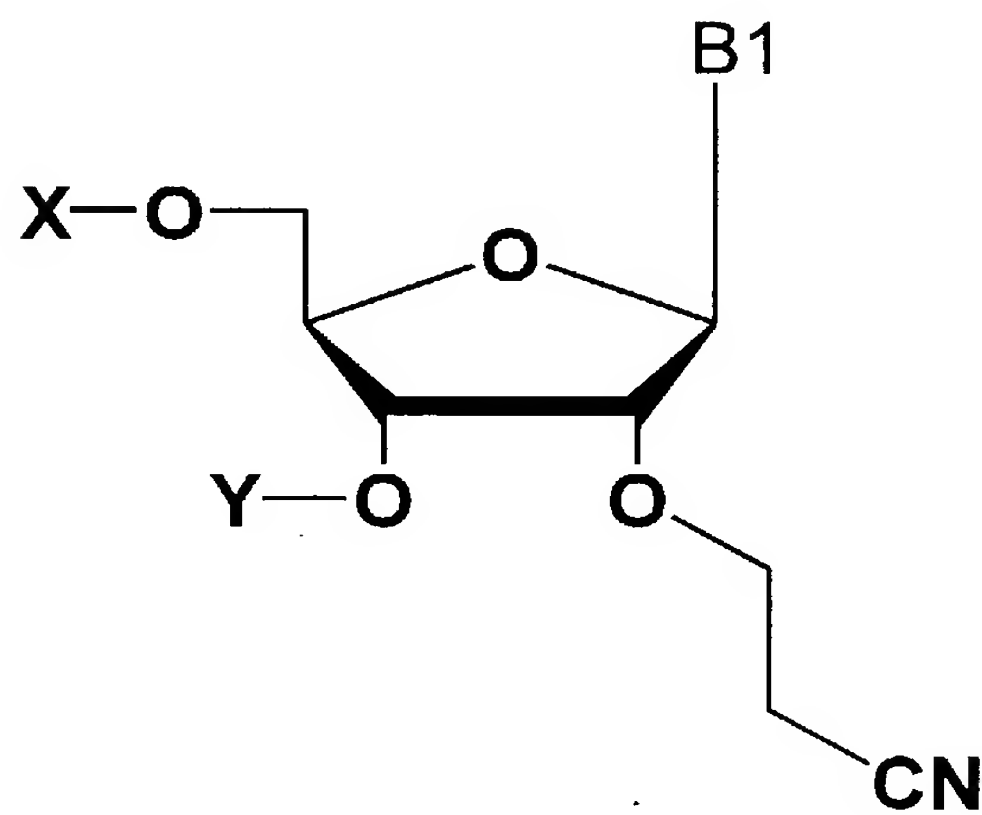
[0131] (式(II)中、 $R1$ および $R2$ は同一または異なって、炭素数1から7のアルキル基を表すか、又は、 $R1$ および $R2$ が互いに結合して環構造を形成し、 $R3$ はリン酸の保護基を表す)を表し、 $B1$ は置換基を有していてもよいピリミジン塩基又はプリン塩基を表す。

)である修飾RNAは遺伝子制御のための人工RNA分子等として有用である。

## 請求の範囲

[1] 一般式(I)で表されるヌクレオシド又はそのヌクレオチド:

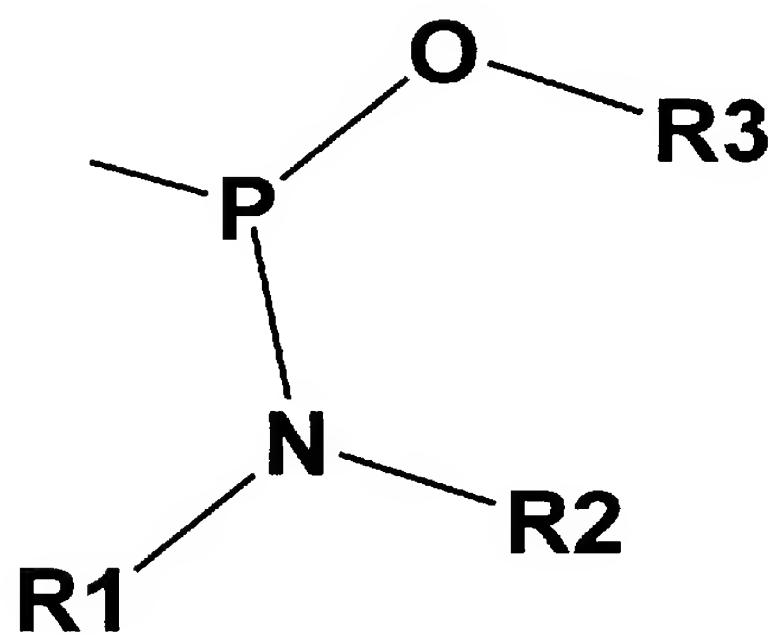
[化1]



(I)

(式I中、X及びYは同一または異なって、水素、置換基を有していてもよいシリル基、4-メトキシトリチル基、4, 4'-ジメトキシトリチル基、又は一般式(II):

[化2]



(II)

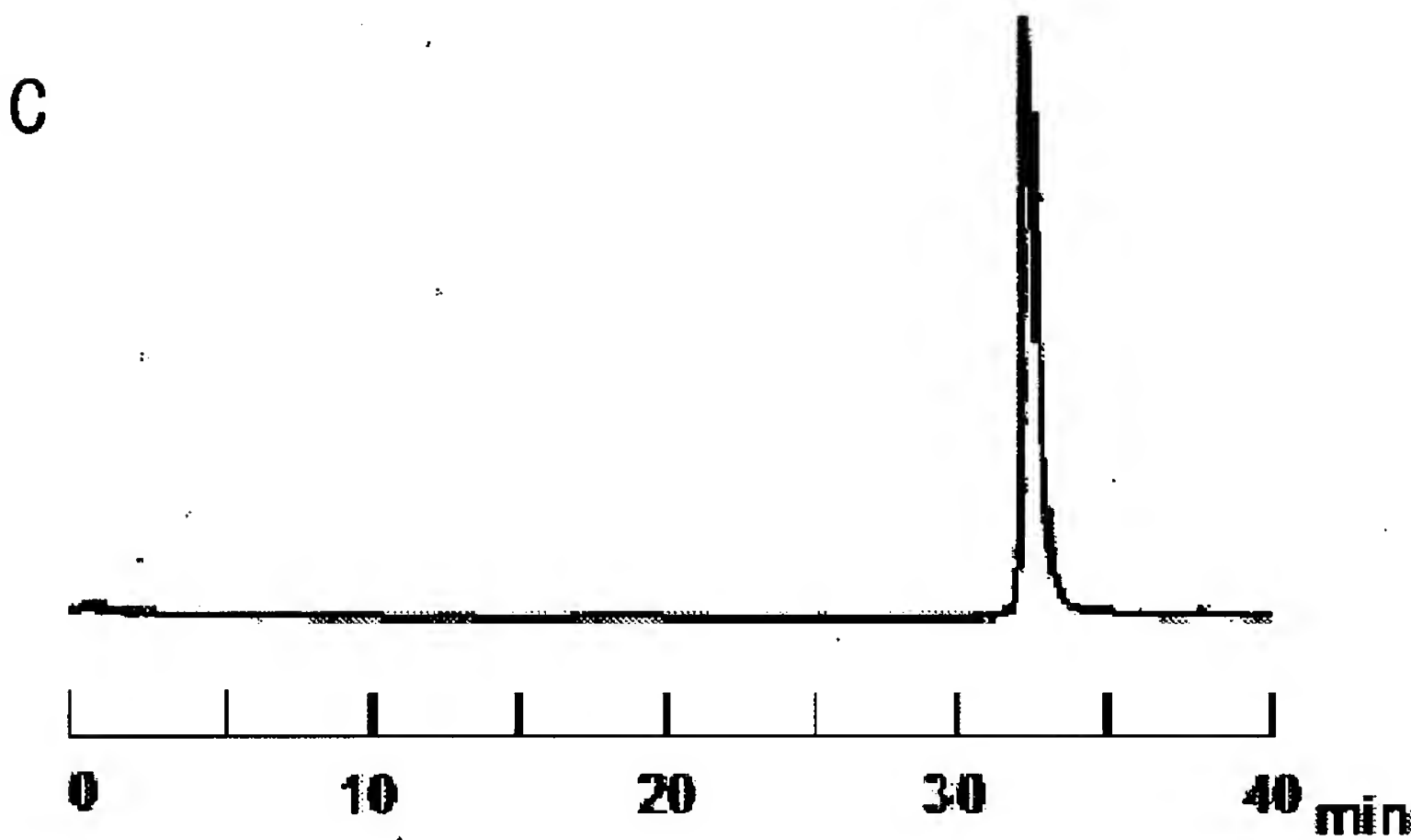
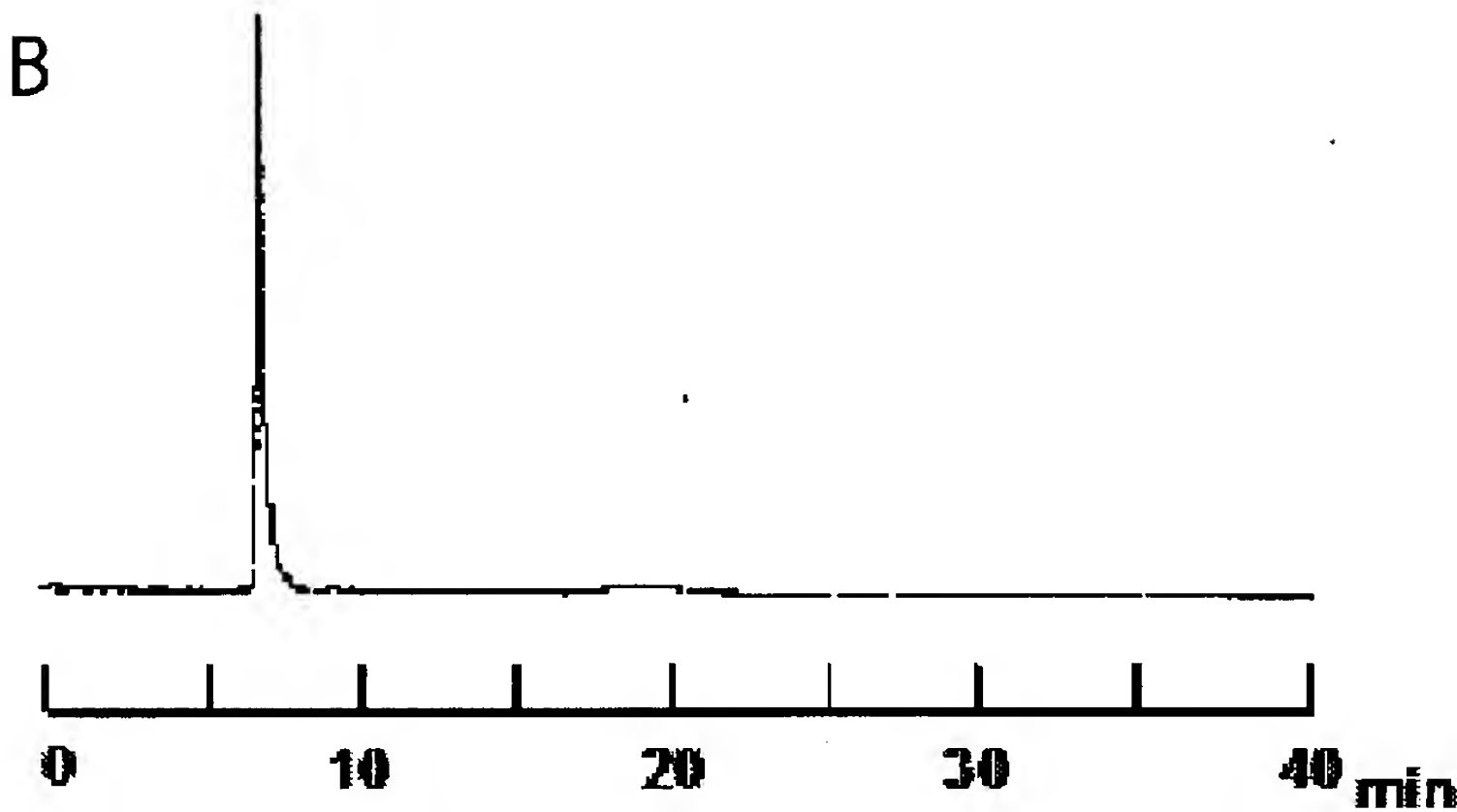
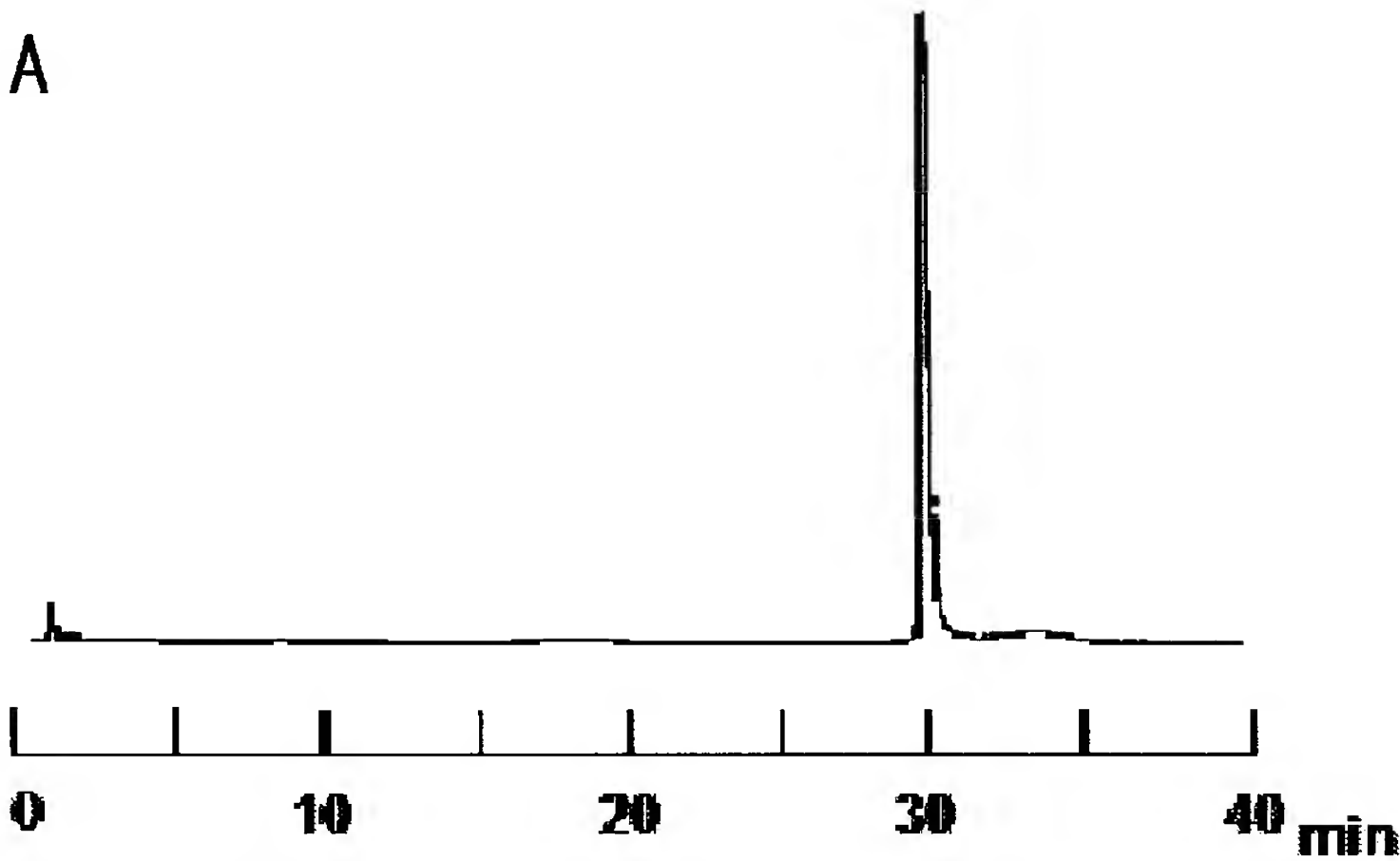


(式(II)中、R1およびR2は同一または異なって、炭素数1から7のアルキル基を表すか、又は、R1およびR2が互いに結合して環構造を形成し、R3はリン酸の保護基を表す)を表し、B1は置換基を有していてもよいピリミジン塩基又はプリン塩基を表す。 )。

- [2] 2'-O-シアノエチルウリジン。
- [3] 2'-O-シアノエチルシチジン。
- [4] 2'-O-シアノエチルアデノシン。
- [5] 2'-O-シアノエチルグアノシン。
- [6] N-4-ジメチルアミノメチレン-2'-O-シアノエチルシチジン。
- [7] N6-ジメチルアミノメチレン-2'-O-シアノエチルアデノシン。
- [8] N2-ジメチルアミノメチレン-6-O-トリイソプロピルベンゼンスルホニル-2'-O-シアノエチルグアノシン。
- [9] N4-アセチル-2'-O-(2-シアノエチル)シチジン。
- [10] N2-ジメチルアミノメチレン-2'-O-シアノエチルグアノシン。
- [11] 請求項1〜10の何れか一項に記載のヌクレオシドの合成方法であって、炭酸セシウム、DBU, 及びTritonBから成る群から選択される少なくとも一種の化合物とアクリロニトリルとヌクレオシド誘導体を合成原料として用い、t-ブチルアルコールの存在下又は非存在下で、2'水酸基をシアノエチルエーテル化することを特徴とする、前記合成方法。
- [12] 炭酸セシウム、DBU, 及びTritonBから成る群から選択される少なくとも一種の化合物をヌクレオシド誘導体に対して0. 1〜30equivの範囲で反応系に存在させ、アクリロニトリルに対して、0. 05〜30equivの範囲のt-ブチルアルコールの存在下に反応を行う、請求項11記載の合成方法。
- [13] 炭酸セシウムを用いる、請求項11又は12に記載の合成方法。
- [14] 20℃〜30℃の温度範囲で反応させる、請求項11〜13の何れか一項に記載の合成方法。
- [15] 反応時間が2時間〜3時間の範囲である、請求項11〜14の何れか一項に記載の合成方法。

- [16] 請求項1ないし10のいずれか一項に記載のヌクレオシドを含むRNAオリゴマー。

[図1]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/003459

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
Int.Cl.<sup>7</sup> C07H19/067, 19/167

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.<sup>7</sup> C07H19/067, 19/167

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2005  
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2005 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2005

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), EMBASE (STN), REGISTRY (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MONIA, Brett. P. et al., 'Antisense modulation of phosphorylase kinase alpha 1 expression', WO 2002/020546 A1 (abstract, RN403861-16-5), CAPLUS[online] [retrieved on 19 April, 2005 (19.04.05)], Retrieved from CAPLUS Accession no. 2002:185142, CA Accession no.136:257259.	1
A	MARTIN, von Pierre, Ein neuer Zugang zu 2', -O- Alkylribonucleosiden und Eigenschaften deren Oligonucleotide.Helvetica.Chimica.Acta., 1995, Vol.78, pages 486, 504	1-16
A	GROTLI, Morten et al., 2'-O- (Carbamoylmethyl) oligoribonucleotides., Tetrahedron, 1999, Vol.55, pages 4299, 4314	1-16



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
22 April, 2005 (22.04.05)

Date of mailing of the international search report  
17 May, 2005 (17.05.05)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/003459

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BEETS, M.G.J. et al., Macrocyclic oxalactones. Rev.trav.chim., 1953, Vol.72, pages 411 to 418	1-16

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.<sup>7</sup> C07H19/067, 19/167

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.<sup>7</sup> C07H19/067, 19/167

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2005年
日本国実用新案登録公報	1996-2005年
日本国登録実用新案公報	1994-2005年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), EMBASE (STN), REGISTRY (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	MONIA, Brett. P. et al., ' Antisense modulation of phosphorylase kinase alpha 1 expression', WO 2002/020546 A1 (abstract, RN 403861-16-5) CAPLUS [online] [retrieved on 19 April 2005] Retrieved from CAPLUS Accession no. 2002:185142, CA Accession no. 136:257259.	1
A	MARTIN, von Pierre, Ein neuer Zugang zu 2'-O-Alkylribonucleosiden und Eigenschaften deren Oligonucleotide. Helvetica Chimica Acta, 1995, Vol. 78, pages 486	1-16

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

22. 04. 2005

国際調査報告の発送日

17. 5. 2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)  
郵便番号 100-8915  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

渡辺 仁

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

4 C

3544

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	and 504	
A	GROTLI, Morten et al., 2'-O-(Carbamoylmethyl)oligoribonucleotides. Tetrahedron, 1999, Vol.55, pages 4299 and 4314	1-16
A	BEETS, M. G. J. et al., Macrocyclic oxalactones. Rev. trav. chim., 1953, Vol.72, pages 411 and 418	1-16